

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Infeção invasiva por *Haemophilus influenzae*: Caracterização
fenotípica e molecular e estudo da virulência de estirpes
isoladas em Portugal**

Catarina Isabel Moreira Heliodoro

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Maria Paula Bajanca Lavado
Professora Doutora Deodália Dias

2017

À minha família, que sempre apoiou as minhas escolhas, me incentivou e me ensinou a importância de se ser determinado e perseverante ~

Dedico este trabalho ao meu irmão.

「終わりと始まり。」

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste último ano realizei o trabalho experimental conducente a esta dissertação, o qual estou certa me ajudou a evoluir, quer a nível académico, quer a nível pessoal. Neste sentido, e uma vez que sozinha tal não teria sido possível, gostaria de prestar o meu sincero agradecimento a algumas pessoas.

Em primeiro lugar, ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, sediado em Lisboa, na pessoa do seu diretor, Doutor Fernando de Almeida, e na do seu vogal, Doutor José Maria Albuquerque, agradeço terem-me permitido realizar, no Laboratório Nacional de Referência de *Haemophilus influenzae* do Departamento do Doenças Infeciosas, o trabalho experimental apresentado nesta dissertação.

À minha orientadora, Doutora Maria Paula Bajanca-Lavado, Investigadora do Departamento do Doenças Infeciosas e Responsável pelo Laboratório Nacional de Referência de *Haemophilus influenzae*, que desde a primeira vez em que a questioneei acerca da possibilidade de realizar esta tese, sempre me tratou com agrado e boa-disposição. Por toda a orientação e ajuda prestadas, conhecimentos transmitidos, conselhos, dedicação, disponibilidade e boa-vontade (por mais ocupada que estivesse), o meu profundo agradecimento.

À minha orientadora na Faculdade de Ciências de Lisboa, Professora Doutora Deodália Dias, professora e coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, por me ter possibilitado a realização desta dissertação, e por toda a disponibilidade.

À Célia Bettencourt, do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Respiratórias a Agentes Bacterianos, por toda a simpatia demonstrada, conversas, partilha de conhecimentos e ajuda, apesar de muito ocupada com o seu trabalho e doutoramento, o meu muito obrigada. E boa sorte!

RESUMO

Haemophilus influenzae é um microrganismo responsável por infecções invasivas graves no Homem, apesar de ser frequentemente encontrado como colonizador do trato respiratório. Este agente patogénico é dinâmico e a sua epidemiologia tem vindo a mudar desde a introdução da vacina nos anos 90. Até à data, foram identificados 6 tipos capsulares (a-f), apesar de a maioria das estirpes caracterizadas atualmente serem não capsuladas (HiNC).

Estudos anteriores caracterizaram a doença invasiva em Portugal, entre 1989-2001 e entre 2002-2010. O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotípica e molecularmente os isolados clínicos de doença invasiva em Portugal, durante um período de 6 anos (2011-2016), e comparar os resultados obtidos com os de estudos realizados anteriormente, bem como identificar a presença/ausência de 6 dos fatores de virulência destas estirpes.

Durante o período de estudo considerado foram analisadas 174 estirpes invasivas, provenientes de 32 hospitais. A cápsula e o serotipo capsular foram identificados e caracterizados através de amplificação por PCR. A produção de β -lactamase foi pesquisada com nitrocefina, e a suscetibilidade aos antibióticos foi determinada pelo método da microdiluição em placa, de acordo com as diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). De modo a avaliar a relação genética entre os isolados, foi realizada a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), para amplificar e sequenciar os fragmentos internos dos 7 genes ‘housekeeping’ – *adh*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi*, e *recA*. O *sequence type* (ST) foi atribuído através da base de dados de MLST para *H. influenzae* (<https://pubmlst.org/hinfluenzae/>), e as distâncias alélicas entre os STs foram representadas através da análise do algoritmo goeBURST, na plataforma PHYLOViZ. A presença/ausência dos fatores de virulência *pilA*, *ompP5*, *hmw1A/hmw2A*, *hifA*, e *hia* foi determinada por amplificação por PCR.

As estirpes HiNC foram as principais responsáveis por doença invasiva (143/174; 82%); no entanto, 31 estirpes (31/174; 17,8%) eram capsuladas e foram caracterizadas como: 4 do serotipo **a** (2,3%), 21 do serotipo **b** (12,1%), 2 do serotipo **e** (1,1%), e 4 do serotipo **f** (2,3%). A maior parte das estirpes eram suscetíveis aos antibióticos estudados, com 12% (21/174) de estirpes resistentes à ampicilina por produção de β -lactamase. O MLST foi realizado para 136 estirpes e revelou elevada variabilidade genética entre 106 HiNC, com 71 STs diferentes (71/106; 67%). Pelo contrário, as estirpes capsuladas eram clonais: **Hib**-ST6 e ST-190, **Hia**-ST23, **Hie**-ST18, e **Hif**-ST124.

Em Portugal, as estirpes HiNC suscetíveis aos antibióticos e apresentando elevada diversidade genética são as principais responsáveis pela doença invasiva a *H. influenzae*, apesar de estirpes Hib ainda circularem numa percentagem considerável no nosso país. Estirpes do serotipo não-b têm vindo a emergir, após a introdução da vacina contra o Hib, nomeadamente os serotipos a e f. Os fatores de virulência estudados, essenciais na fase de adesão ao hospedeiro, não se encontram obrigatoriamente em todas as estirpes e a sua presença não está associada a uma maior gravidade da infeção. No entanto, eventos como recombinação genética, ou variação de fase, estão entre os fatores que mais contribuem para o *fitness* do microrganismo, aquando da colonização da nasofaringe, contribuindo para uma maior patogenicidade, principalmente das estirpes HiNC. Devido à sua dinâmica evolutiva, é necessária a continuação da vigilância da doença invasiva a *H. influenzae* em Portugal, para que se possam desenvolver estratégias de prevenção adequadas.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae*; Doença invasiva; HiNC; MLST; Fatores de virulência

ABSTRACT

Haemophilus influenzae is an important pathogen, responsible for invasive disease, despite being one of the most common upper respiratory tract colonizers. This pathogen is dynamic and its epidemiology has been changing since vaccine introduction in 1990s. Six capsular types (a-f) have been identified, although now most characterized strains are non-capsulated (HiNC).

Previous studies have characterized invasive isolates recovered in Portugal, between 1989-2001 and 2002-2010. We aim to phenotypically and molecularly characterize invasive isolates recovered in Portugal, over a 6-year period (2011-2016), compare these results with the previous ones, and identify the presence/absence of 6 selected virulence factors.

During the study period, as part of a laboratory-based surveillance system, we received 174 invasive isolates, from 32 different Portuguese hospitals. Capsular status and serotype was identified and characterized by PCR amplification. β -lactamase production was assessed with nitrocefin, and antibiotic susceptibility was determined by the microdilution assay, according to the *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) guidelines. To assess genetic relatedness among isolates *Multilocus Sequence Type* (MLST) was performed by amplifying and sequencing internal fragments of the 7 housekeeping genes – *adk*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi*, and *recA*. Sequence type (ST) was assigned at <https://pubmlst.org/hinfluenzae/>, and the allelic distances between the STs were displayed using goeBURST analysis, through PHYLOViZ platform. The presence/absence of the virulence factors *pilA*, *ompP5*, *hmw1A/hmw2A*, *hifA*, and *hia* was determined by PCR amplification.

Invasive disease was mainly due to HiNC strains (143/174; 82%); 31 isolates (17.8%) were capsulated and characterized as follows: 4 serotype **a** (2.3%), 21 **b** (12.1%), 2 **e** (1.1%), and 4 **f** (2.3%). Most strains were susceptible to antibiotics, with 12% (21/174) being β -lactamase producers. MLST, performed for 136 isolates, revealed high genetic variability among 106 HiNC isolates, with 71 different STs (67%). Capsulated isolates were clonal: **Hib**-ST6 and ST-190, **Hia**-ST23, **Hie**-ST18, and **Hif**-ST124.

In Portugal, invasive disease is predominantly due to susceptible, highly genetically diverse HiNC strains, although Hib strains are still circulating in the country. Non-b serotype strains have also been emerging, after Hib vaccine introduction. The 6 studied virulence factors, which are important for adherence to host cells, are not necessarily found in all strains, nor are associated with a higher level of infection. Genetic recombination events and phase variation are among the factors that contribute to the overall fitness of the pathogen, mainly among HiNC strains. Due to its evolving dynamics, ongoing surveillance is needed, in order to better understand the burden of the disease and develop appropriate public health prevention strategies.

Key-words: *Haemophilus influenzae*; Invasive disease; HiNC; MLST; virulence factors

PUBLICAÇÕES NO ÂMBITO DESTE TRABALHO

Heliodoro, C.I.M., Bajanca-Lavado, M.P. Characterization of *Haemophilus influenzae* invasive disease in Portugal: 2011-2016. Poster (Nº 30) apresentado no 2º Dia do Jovem Investigador do INSA. Maio 2017.

Heliodoro, C.I.M., Bettencourt, C.R, Bajanca-Lavado, M.P & the Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive infection. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* invasive disease in Portugal, 2011–2016. Poster (Nº 21) apresentado no 14º Congresso do EMGM, European Meningococcal and *Haemophilus Influenzae* Disease Society. 18-21 de Setembro 2017, Praga.

(A participação neste Congresso foi financiada (através de uma bolsa) pelo EMGM)

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
PUBLICAÇÕES NO ÂMBITO DESTE TRABALHO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FAMÍLIA PASTEURELLACEAE E GÊNERO <i>HAEMOPHILUS</i>	1
1.2 SEROTIPO CAPSULAR	3
1.3 TIPAGEM MOLECULAR	6
1.4 ANTIBIÓTICOS, SUSCETIBILIDADE E RESISTÊNCIA	8
1.5 ESTRUTURA POPULACIONAL E EPIDEMIOLOGIA	10
1.6 PATOGÊNESE E MECANISMO DE INFECÇÃO	12
1.7 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	17
2.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA	19
2.3 PESQUISA DA PRODUÇÃO DE β -LACTAMASE	19
2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	20
2.5 DETECÇÃO DA CÁPSULA E DETERMINAÇÃO DO SEROTIPO CAPSULAR	21
2.6 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)	21
2.7 DETECÇÃO DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA	23
3. RESULTADOS	25
3.1 PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DA CÁPSULA	25
3.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	26
3.3 PRODUÇÃO DE β -LACTAMASE	28
3.4 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)	28
3.5 DETECÇÃO DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA	31
4. DISCUSSÃO	37
4.1 PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DA CÁPSULA	37
4.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	39
4.3 PRODUÇÃO DE β -LACTAMASE	40
4.4 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)	41
4.5 DETECÇÃO DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1. Morfologia e coloração de Gram das colónias de <i>Haemophilus influenzae</i> ...	3
Figura 1.2.1. Representação esquemática do locus cap..	5
Figura 1.2.2. Representação esquemática do processo de pesquisa de cápsula e determinação do serotipo capsular.....	6
Figura 1.5.1. Países onde a vacina contra o Hib foi introduzida no Programa Nacional de Vacinação.....	11
Figura 1.6.1. Representação esquemática do processo de patogénese em <i>Haemophilus influenzae</i> ...	12
Figura 3.1.1. Distribuição das estirpes de <i>H. influenzae</i> pelos grupos etários definidos e pelo género do paciente.....	25
Figura 3.3.1. Percentagem de estirpes produtoras de β -lactamase.....	28
Figura 3.4.1. Representação esquemática da diversidade genética entre os isolados de <i>H. influenzae</i> (n=136), de acordo com o algoritmo goeBURST.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.7.1. Sumário das características principais dos 6 genes de virulência estudados – <i>pilA</i> , <i>ompP5</i> , <i>hifA</i> , <i>hmw1A/2A</i> , e <i>hia</i>	16
Tabela 2.1.1. Caracterização das estirpes clínicas invasivas de <i>Haemophilus influenzae</i> , isoladas em Portugal, entre 2011 e 2016, tendo em conta a origem do produto biológico, o género, o grupo etário ao qual os indivíduos pertencem e a localização geográfica dos hospitais que providenciaram as amostras.....	18
Tabela 2.1.2. Origem das estirpes clínicas invasivas de <i>Haemophilus influenzae</i> , isoladas em Portugal, entre os anos de 2011 e 2016.....	19
Tabela 2.4.1. Categorias de suscetibilidade, CIM (mg/L), para <i>H. influenzae</i> , de acordo com os <i>breakpoints</i> estabelecidos pelo EUCAST 2017 (13 antibióticos).....	20
Tabela 3.1.1. Pesquisa e caracterização da cápsula: 2011 – 2016.....	26
Tabela 3.2.1. Suscetibilidade aos antibióticos das 171 estirpes estudadas, de acordo com as categorias e <i>breakpoints</i> estabelecidos pelo EUCAST: CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e percentagem (%) de estirpes suscetíveis (S), intermédias (I) e resistentes (R).....	27
Tabela 3.4.1. Perfis alélicos dos isolados de <i>H. influenzae</i> com ST não definido na base de dados internacional (“novos”).....	31
Tabela 3.5.1. Presença/Ausência de 6 genes determinantes de virulência.....	31
Tabela 3.5.2. Presença/Ausência dos genes determinantes de virulência relativamente ao estado capsular.....	32
Tabela 3.5.3. Presença/Ausência (+/-) dos 6 genes de virulência estudados - <i>pilA</i> , <i>ompP5</i> , <i>hifA</i> , <i>hmw1A/2A</i> e <i>hia</i> relativamente à produção de β -lactamase, estado capsular e ST.....	33
Tabela 3.5.4. Presença/Ausência (+/-) dos 6 genes de virulência estudados - <i>pilA</i> , <i>ompP5</i> , <i>hifA</i> , <i>hmw1A/2A</i> e <i>hia</i> nas estirpes para as quais foram detectados pelo menos 3 dos genes estudados.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. <i>Primers</i> utilizados para a detecção e amplificação da região específica da cápsula (Falla <i>et al.</i> 1994).....	60
Anexo II. <i>Primers</i> utilizados para amplificação da região específica dos 7 genes “housekeeping” em <i>H. influenzae</i> (Meats <i>et al.</i> , 2003) e tamanhos dos produtos esperados (pb).....	61
Anexo III. <i>Primers</i> utilizados para a detecção da presença/ausência dos fatores de virulência e respectivos tamanhos dos produtos esperados (pb).....	62
Anexo IV. Controlos utilizados nos ensaios de detecção de presença/ausência dos genes determinantes de virulência.....	63
Anexo V. Representação esquemática do <i>coding DNA sequence</i> (cds) dos genes <i>pilA</i> , <i>pilB</i> , <i>pilC</i> e <i>pilD</i> , pertencentes ao <i>cluster pilABCD</i>	64
Anexo VI. Representação esquemática do cds do gene <i>ompP5</i>	65
Anexo VII. Representação esquemática do cds do gene <i>hmw1A</i> e genes acessórios <i>hmw1B</i> e <i>hmw1C</i>	66
Anexo VIII. Representação esquemática do cds do gene <i>hmw2A</i> e genes acessórios <i>hmw2B</i> e <i>hmw1C</i>	67
Anexo IX. Representação esquemática do cds do gene <i>hia</i>	68
Anexo X. Representação esquemática do cds do gene <i>hifA</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS

A presente lista encontra-se organizada por ordem alfabética, e com a seguinte forma: primeiro, a abreviatura do termo técnico, seguida da definição correspondente.

No texto, é inicialmente apresentado o termo com a abreviatura entre parênteses.

Alguns dos termos técnicos foram mantidos tal como são reconhecidos internacionalmente, uma vez que já fazem parte do vocabulário científico estabelecido. Para os restantes casos, e sempre que possível, foi incluída a tradução para a língua portuguesa.

a.a – Aminoácido

adk – Adenilato cinase

Amc – Amoxicilina – Ácido Clavulânico

Amp – Ampicilina

atpG – ATP sintase, do inglês Adenosine triphosphate synthase gamma chain

Azi – Azitromicina

βla + – β-lactamase positivo

βla - – β-lactamase negativo

BLNAR – Estirpes não produtoras de β-lactamase e resistentes à ampicilina

BLPAR – Resistência à ampicilina mediada por β-lactamases

BLPACR – Estirpes produtoras de β-lactamase e resistentes à ampicilina e ao co-amoxiclave

C – Cloranfenicol

CC – Complexo clonal

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controlo de Doenças)

Cds – Coding DNA sequence

CEACAM-1 – do inglês, Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1; glicoproteína biliar

Cfr – Cefaclor

Cft – Cefotaxima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM₅₀ – Concentração Inibitória Mínima que inibe 50% dos isolados

CIM₉₀ – Concentração Inibitória Mínima que inibe 90% dos isolados

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

Crm – Cefuroxima

Cp – Ciprofloxacina

Cpe – Cefepime

dATP – 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP – 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato

dGTP – 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dTTP – 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato

ECM – Matriz extracelular

ESBL – β-lactamase de largo espectro

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FASTA - Formato baseado em texto para representar sequências de nucleótidos

frdB – Fumarato redutase

fucK – Fuculose cinase

fur – do inglês, Ferric uptake regulator

hap – autotransportador; do inglês, *Haemophilus* adhesion protein
hia – do inglês, *Haemophilus influenzae* adhesin
Hia – *Haemophilus influenzae* do serotipo a
Hib – *Haemophilus influenzae* do serotipo b
Hid – *Haemophilus influenzae* do serotipo d
Hie – *Haemophilus influenzae* do serotipo e
Hif – *Haemophilus influenzae* do serotipo f
hifA – gene precursor de fímbrias, e um dos genes de virulência em *H. influenzae*
HiNC – *Haemophilus influenzae* Não Capsulado
HMW1/2 – do inglês, High Molecular Weight Adhesin
Hsf – Fibrila de superfície em *H. influenzae*
HTM - *Haemophilus* Test Medium
ICAM1 – do inglês, Intercellular Adhesion Molecule 1
IgG – Imunoglobulina G
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LOS – Lipooligossacárido
mdh – Malato desidrogenase
Mer – Meropenem
MLST – *Multilocus Sequence Typing*
NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ompP5 – Proteína de membrana externa P5, e um dos genes de virulência em *H. influenzae*
OMV – Vesículas de membrana externa
ORF – do inglês, Open Reading Frame
pb – par de bases
PBPs – Proteína de ligação à penicilina
PCR – Reação em cadeia de polimerase
pgi – Glucose-6-fosfato isomerase
pilA – Subunidade principal do pilus de Tipo IV, e um dos genes de virulência em *H. influenzae*
PNV – Plano Nacional de Vacinação
PRP – Poli-ribosil-ribitol
recA – Proteína RecA
Rif – Rifampicina
SSR – do inglês, Simple Sequence Repeats
ST – Sequence type
SXT – Trimetoprima/Sulfametoxazol
TBE - Tampão Tris-borato-EDTA
Te – Tetraciclina
Tbp1/2 – do inglês, Transferrin binding protein
Tfp – Pilus de Tipo IV
WHO – World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

O *Haemophilus influenzae*, para além de ser um comensal da nasofaringe, é também um importante agente patogénico para o Homem. Em Portugal, a infeção invasiva encontra-se estudada nos períodos pré- e pós-vacina (até 2010), não havendo ainda estudos relacionados com a virulência das estirpes não capsuladas de *H. influenzae* (HiNC) que, nos últimos anos, têm sido a principal causa das infeções graves.

Pretende-se conhecer a epidemiologia da infeção invasiva a *H. influenzae* em Portugal, relativamente ao período entre 2011 e 2016, caracterizando fenotípica e molecularmente os isolados clínicos, assim como identificando a presença/ausência de alguns dos principais determinantes de virulência destas estirpes.

1.1 FAMÍLIA PASTEURELLACEAE E GÉNERO HAEMOPHILUS

Haemophilus influenzae é uma bactéria pertencente ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pasteurellales*, família *Pasteurellaceae*, género *Haemophilus* e espécie *influenzae*.

A família *Pasteurellaceae* consiste atualmente em cerca de 100 espécies conhecidas e espécies de taxa ainda por definir, (Christensen *et al*, 2014; <http://www.the-icsp.org/taxonomic-subcommittees?id=15>, visualizado em Fevereiro de 2017), distribuídos por 25 *genera*. Os 4 maiores géneros da família *Pasteurella* são *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Actinobacillus* e *Mannheimia* (<http://www.pasteurellaceae.eu/>, visualizado em Fevereiro de 2017). Alguns relatórios sugerem ainda a reclassificação de alguns dos géneros, ou nomeação de novos géneros, com base na sua taxonomia filogenética (Christensen & Bisgaard, 2008).

A maioria dos membros da família *Pasteurellaceae* são espécies comensais do trato respiratório superior ou cavidade oral, encontrando-se de tal modo adaptados que muitas espécies dificilmente sobrevivem muito tempo em outro habitat. As espécies patogénicas são ainda um fator importante para a produção animal e saúde humana (Christensen *et al*, 2014).

De um modo geral, apresentam genomas relativamente pequenos, provavelmente uma consequência da sua adaptação a um habitat tão específico (Naushad *et al*, 2015). O padrão de partições nos genes parece ainda indicar um conjunto principal de cerca de 600 genes comum a todos os membros desta família (*core genome*). O *core genome* é geralmente responsável pelos principais traços fenotípicos da espécie, existindo ainda o *accessory genome*. O genoma acessório é constituído por famílias de genes partilhadas por um pequeno grupo de estirpes ou por genes específicos, que se encontram associados a vias metabólicas e a funções que poderão conferir vantagem selectiva. O género *Haemophilus* é particularmente polifilético (Bonaventura *et al*, 2010).

O género *Haemophilus* encontra-se associado a uma série de patologias, entre as quais pneumonia, meningite e cancro mole, sendo o *H. influenzae* uma das espécies de maior importância como patógeno humano (Naushad *et al*, 2015). As suas infeções podem ser de 2 tipos: doença não invasiva, normalmente caracterizada por infeções crónicas, nas quais o *H. influenzae* não é usualmente a causa primária, e doença invasiva, caracterizada por casos de infeção aguda. O estudo apresentado nesta dissertação é apenas relativo aos casos de doença invasiva.

A morfologia de *H. influenzae* é a de cocobacilos Gram-negativos (Figura 1.1.1), imóveis e pleomórficos. São aeróbios (apresentam capacidade de crescimento facultativo em ambientes anaeróbios) que crescem idealmente a uma temperatura entre os 35°C e os 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂. É considerado fastidioso, requerendo a presença obrigatória de 2 fatores para o seu crescimento *in vitro*, o fator V e o fator X.

O fator V corresponde ao nicotinamida adenina nucleotídeo (NAD), e é necessário para os processos de oxidação-redução do mecanismo celular bacteriano. Por outro lado, o fator X corresponde à hemina, isto é, uma protoporfirina IX que contém um grupo hemo B com o ião cloreto (Cl⁻) como ligando, e que é necessária à síntese do citocromo c e outras enzimas respiratórias (Reidl *et al*, 2000; Tristram *et al*, 2007; King *et al*, 2015). O grupo hemo não é necessário ao crescimento em condições anaeróbias, mas aparenta ser importante para a virulência da estirpe (Erwin *et al*, 2007).

A estrutura da sua parede celular (Figura 1.1.2) corresponde à estrutura típica das bactérias Gram-negativas, sendo composta por uma camada de peptidoglicano (rígida), com função protetora. É ainda constituída pela membrana externa (atua na prevenção da perda de proteínas periplasmáticas e que são específicas de cada estirpe, e evita o acesso de enzimas hidrolíticas e de alguns antibióticos ao peptidoglicano), lipoproteínas (estabilizam a membrana externa, fixando-a à camada de peptidoglicano) e pelo lipooligosacárido (LOS), que apresenta função de endotoxina (Erwin *et al*, 2007; Rahman, 2008; Ulanova *et al*, 2014).

H. influenzae é um comensal do trato respiratório superior e da nasofaringe e encontra-se presente nas membranas mucosas de cerca de 75% das crianças e indivíduos adultos saudáveis (Todar, 2008). Num estudo realizado em Portugal, por Sá-Leão e colaboradores, em 87% das amostras recolhidas em crianças de uma creche detetou-se a presença deste comensal (Sá-Leão *et al*, 2008).

É um organismo perfeitamente adaptado, causando infeção ou doença quando o sistema imunitário do seu hospedeiro se encontra debilitado (Rahman, 2009). Tem sido largamente usado como modelo em estudos de investigação, tendo inclusive sido o primeiro organismo a ter o seu genoma completamente sequenciado (Fleishmann *et al*, 1995; Farshid & Riesbeck, 2014).

O seu genoma consiste no seu DNA cromossomal (circular), que pode variar entre 1,8 Mb e 2,0 Mb (Giufre *et al*, 2015; Naushad *et al*, 2015), num valor médio de 1,88 Mb para as estirpes HiNC (Giufre *et al*, 2015). É constituído por aproximadamente 1740 genes codificantes de proteínas (Fleishmann *et al*, 1995), sendo que um estudo mais recente aponta para a existência de 1870 genes codificantes, incluindo genes putativos (Giufre *et al*, 2015), 58 tRNA e outros 18 RNA (Fleishmann *et al*, 1995). As várias estirpes apresentam ainda uma média de 38% de conteúdo G-C (Naushad *et al*, 2015).

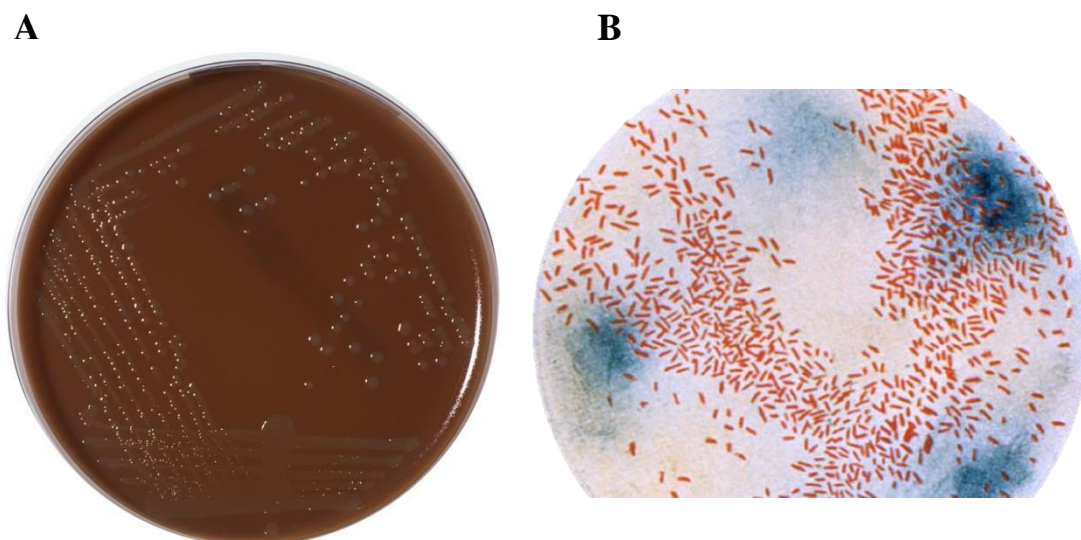


Figura 1.1.1. Morfologia e coloração de Gram das colônias de *Haemophilus influenzae*. (A) Colônias de *H. influenzae* em placa de gelose chocolate com PolyViteX (<http://www.biomerieux-culturemedia.com/upload/20160513105001.jpg>, visualizado em Junho de 2017) (B) Coloração de Gram de *H. influenzae* onde se observa a sua morfologia pleomórfica (https://www.cdc.gov/hi-disease/images/phil_1947.jpg, visualizado em Junho de 2017).

1.2 SEROTIPO CAPSULAR

Um dos fatores de virulência mais estudados e reconhecido como estando diretamente envolvido no grau de patogenicidade de uma determinada estirpe é a cápsula (Moxon, 1993; Murphy *et al*, 2009), que tem a principal função de evitar a opsonização e fagocitose por parte dos neutrófilos (Rahman, 2009). Foi primeiramente demonstrado em 1931, após se ter verificado que estirpes isoladas de casos de infecção invasiva possuíam cápsula, ao contrário de estirpes isoladas de indivíduos saudáveis (Pittman *et al*, 1931).

As formas capsuladas de *H. influenzae* são classificadas em 6 tipos, de **a** a **f**, que diferem na estrutura química dos seus polissacáridos capsulares, e são normalmente identificáveis por meio de uma reação de aglutinação com antisoros específicos (Satola *et al*, 2003; van Eldere *et al*, 2014).

A cápsula é uma estrutura que apresenta baixa atividade antigénica, não ativando assim a resposta imune via sistema complemento. Deste modo, favorece a invasão dos fluidos estéreis por parte de *H. influenzae*, sem agravamento da resposta inflamatória. É constituída por um polissacarídeo que contém 2 hexoses, no caso das estirpes capsuladas dos serotipos **a**, **c**, **d**, **e** e **f**, e 2 pentoses monossacarídicas no caso das estirpes do serotipo **b**. Para além disto, a cápsula das estirpes do serotipo **b** é constituída por fosfato de poli-ribosil-ribitol (PRP, *polyribosil-ribitol-phosphate*), que é composto por ácido teicóico linear contendo ribose, ribitol (álcool contendo uma pentose) e um fosfato ligado por ligações fosfodiéster (Rahman, 2009). *H. influenzae* do serotipo **b** (Hib) apresenta ainda uma sobreprodução de material capsular (hidrofílico), que determina uma maior resistência à dissecação e favorece assim a transmissão entre indivíduos, e conferindo um maior grau de inibição da fagocitose (Kroll & Moxon, 1988).

A determinação do serotipo capsular pode ser efetuada com recurso a técnicas moleculares, em que é avaliada a presença ou ausência do gene responsável pela cápsula, com posterior

caracterização do gene específico para cada serotipo capsular, nomeadamente através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). No caso das estirpes capsuladas, e utilizando os *primers* específicos descritos para o gene conservado da cápsula, *bexA*, é amplificado um produto com 343 pb (Falla *et al*, 1994).

Esta técnica permite a deteção do *locus cap* (fragmento de 17 Kb no cromossoma), que na sua zona central consiste em 3 regiões. As regiões I e III (*bexDCBA* e *hcsAB*) são comuns a todos os serotipos capsulares e os genes necessários ao processamento e transporte encontram-se altamente conservados (Kroll *et al*, 1990; Satola *et al*, 2003; St Geme III *et al*, 2006; Davis *et al*, 2011). Se o gene *hcsA* estiver inativo, haverá uma diminuição parcial do polissacarídeo associado à superfície da bactéria, e um aumento na quantidade de polissacarídeo no periplasma. A inativação do gene *hcsB*, ou de ambos os genes, leva à perda total do polissacarídeo associado à superfície celular e à sua acumulação no periplasma, o que implica que o *hcsA* e o *hcsB* são genes que se complementam no transporte do polissacarídeo através da membrana externa, para a superfície celular, e são essenciais para a virulência (St Geme III *et al*, 2006; Schouls *et al*, 2008).

As estirpes dos serotipos **a**, **c**, **d**, **e** e **f** possuem uma cópia do *locus cap*, enquanto que as estirpes do serotipo b possuem 2 cópias do mesmo, que se encontram separadas entre si, e ligadas a elementos de inserção (IS1016). A região II contém genes específicos de cada serotipo, envolvidos na biossíntese da cápsula (Davis *et al*, 2011; van Eldere, 2014).

Evidências recentes apontam que estirpes de *H. influenzae* do serotipo b incapazes de produzir cápsula possuem uma única cópia do gene *capB*, sendo portanto menos virulentas (Waksman *et al*, 2005; Winn *et al*, 2006; Rahman, 2009). Por outro lado, foram reportados casos de estirpes do serotipo a que possuem 2 cópias do *locus cap*, uma cópia inteiramente funcional, e uma outra cópia com uma deleção parcial do IS1016-*bexA*, estando este acontecimento associado a casos de doença severa (Kapogiannis *et al*, 2005; Lima *et al*, 2010; Giufrè *et al*, 2017).

Os métodos de PCR que apenas se baseiam na deteção do gene *bexA* podem assim falhar na identificação das variantes com alteração de capacidade de síntese da cápsula, uma vez que a região 5' do primer hibridiza com a região deletada do gene *bexA* (Falla *et al*, 1994).

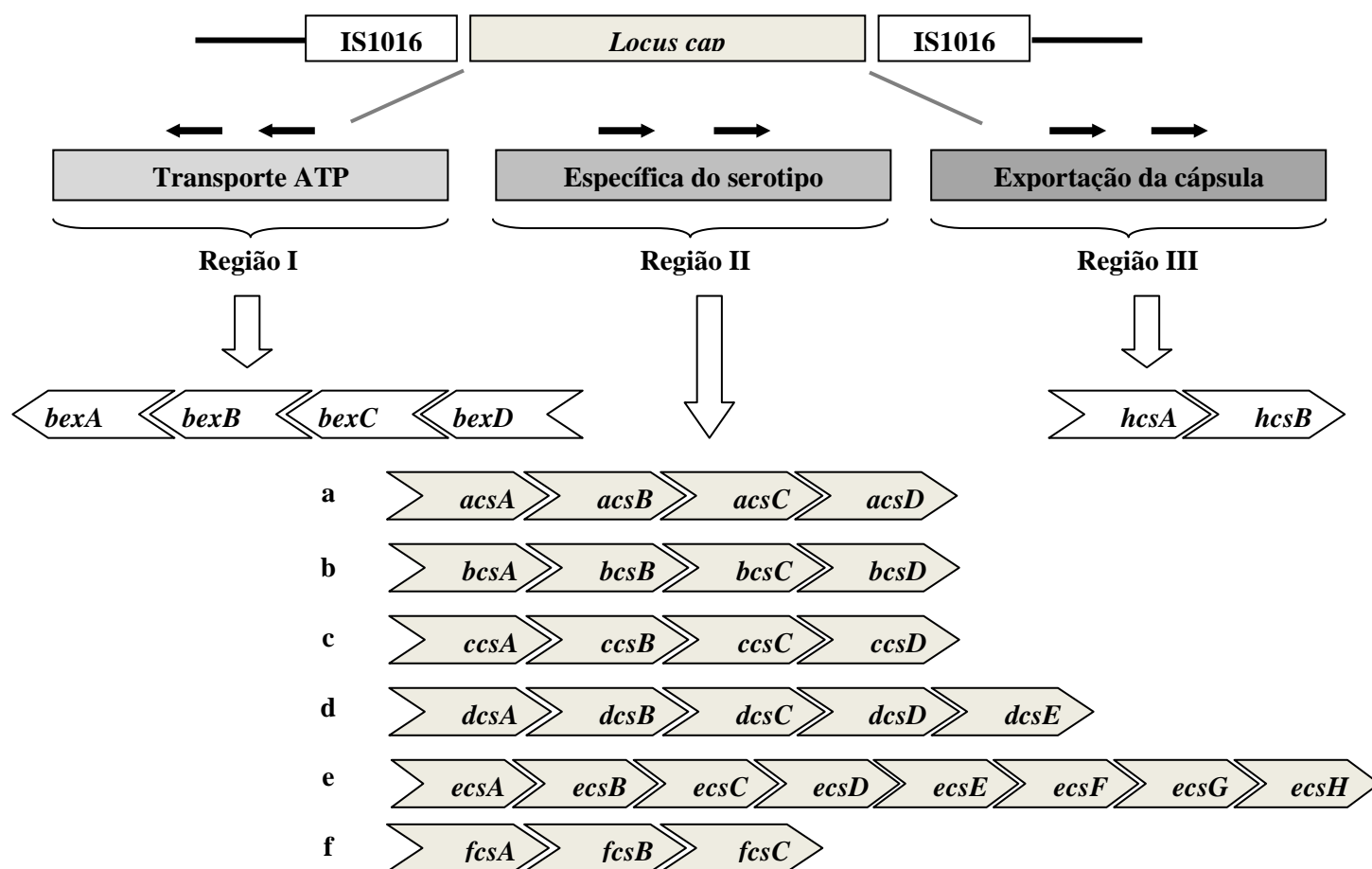


Figura 1.2.1. Representação esquemática do locus *cap*. O locus *cap* pode ser categorizado com base na posição relativa no genoma do elemento de inserção IS1016. O locus *cap* encontra-se dividido em 3 regiões (I, II, e III), com diferentes funções. O gene *bexA* encontra-se localizado na Região I. A região II é específica do serotipo, como indicado. As setas de cor preta indicam a direção de transcrição dos genes.

As estirpes de *H. influenzae* são inicialmente divididas em 2 grandes grupos, estirpes capsuladas e estirpes não capsuladas (HiNC), sendo este último grupo subdividido tendo em conta a razão pela qual a estirpe não possui cápsula: devido à ausência de maquinaria celular adequada à síntese de cápsula (*locus cap* completamente ausente, por fenómenos ocorridos ao longo da evolução) ou devido a uma deleção do gene responsável pela formação da cápsula.

Estirpes com uma deleção parcial deste gene são incapazes de realizar o transporte do polissacarídeo (da cápsula) para a superfície celular. Deste modo, não têm capacidade para produzir uma cápsula funcional, e aparentam ser estirpes HiNC, uma vez que não são serotipáveis pelos métodos convencionais, como a aglutinação ou o PCR (Davis *et al*, 2011; van Eldere, 2014).

Um método baseado na deteção do gene *bexB* da região I por PCR pode, em alternativa, ser usado para pesquisa da cápsula, uma vez que permite a distinção das estirpes verdadeiramente HiNC das estirpes que o são devido a uma deleção completa ou parcial do *locus cap*, não estando ainda reportados casos com deleções parciais do gene *bexB*, análogas às observadas no *bexA* (Davis *et al*, 2011).

Cerquetti e colaboradores (Cerquetti *et al*, 2000) reportaram uma percentagem de 4,4% de estirpes não invasivas do serotipo b que não amplificaram usando primers específicos para o *bexA*,

mas continham regiões específicas do tipo b. Num outro estudo, (Nelson & Smith, 2010) em que se utilizou a técnica de PCR *multiplex* para amplificar o *bexA*, bem como as regiões específicas do *locus cap*, foi também identificado um pequeno número de estirpes com ausência do *bexA* e presença de regiões específicas *cap* b. Apesar de serem raros os casos de variantes não capsuladas devido a uma deleção no gene ($\approx 1\% - 3\%$), a sua identificação e estudo são importantes para o conhecimento global das estirpes de *H. influenzae* responsáveis quer pela infecção invasiva como pela não invasiva.

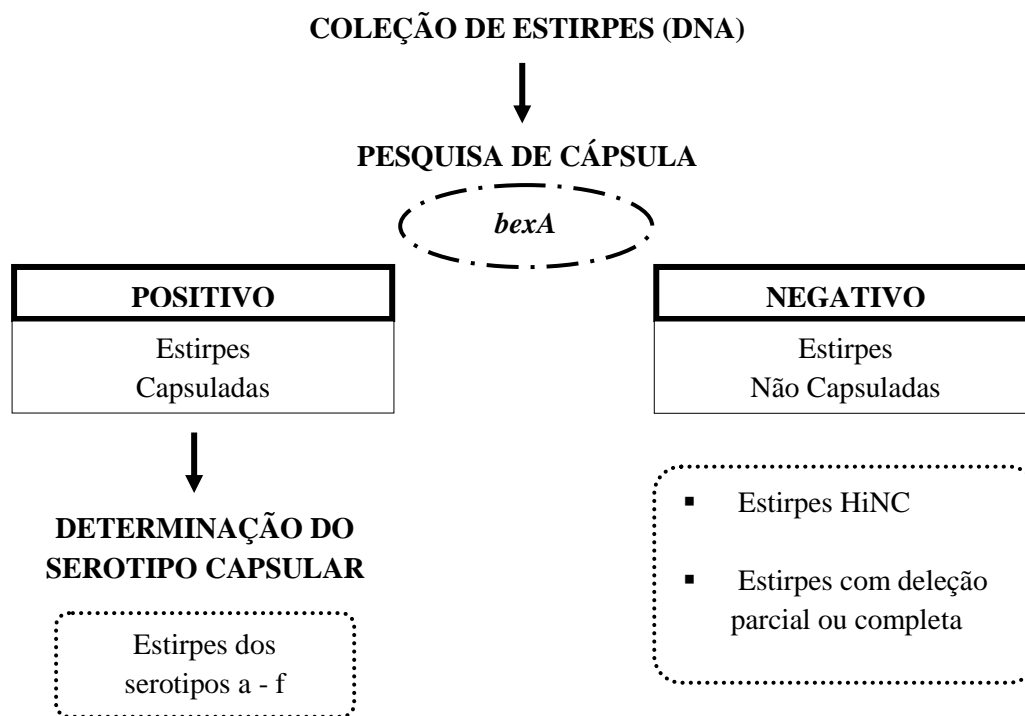


Figura 1.2.2. Representação esquemática do processo de pesquisa de cápsula e determinação do serotipo capsular. A pesquisa de cápsula é feita a partir do DNA extraído de cada estirpe. Caso o resultado do PCR confirme a presença de cápsula, a estirpe é serotipável. O seu serotipo capsular é posteriormente determinado, com *primers* específicos. Caso o resultado de PCR indique a ausência de cápsula, a estirpe é identificada como sendo não capsulada. É de destacar que este resultado poderá ser devido a um dos 2 motivos acima referidos.

1.3 TIPAGEM MOLECULAR

Métodos de tipagem microbiana são ferramentas essenciais para estudos epidemiológicos e das populações bacterianas. Estas técnicas permitem a caracterização da estirpe, fornecendo informações importantes para a vigilância de doenças infecciosas como por exemplo: surtos, estudos de patogénese, historial da infeção e genética populacional.

Avanços nas tecnologias de sequenciação e a diminuição nos seus custos têm vindo a promover a utilização de métodos baseados na sequenciação, em substituição das metodologias moleculares tradicionais, devido aos seus resultados reprodutíveis e aplicabilidade generalizada (van Belkum *et al*, 2001; Tang *et al*, 2013).

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) combinou um conjunto de técnicas e conceitos desenvolvidos ao longo de 2 décadas (Maiden *et al*, 1998; Urwin *et al*, 2003; Maiden *et al*, 2006). Um conceito-chave foi o reconhecimento de que as bactérias não têm necessariamente uma estrutura populacional clonal (Maynard *et al*, 1993), o que levou à ideia de que os padrões de troca genética entre bactérias, e consequentemente, os padrões de descendência, só poderiam ser compreendidos através da análise de sequências nucleotídicas provenientes de múltiplos locais do cromossoma. A vantagem da sequenciação é a de facilitar a comparação dos resultados inter e intra-laboratoriais, criando-se bases de dados internacionais, como é o exemplo da base de dados de MLST: <https://pubmlst.org/hinfluenzae/> (Chan *et al*, 2001; Jolley *et al*, 2004).

A técnica de MLST proporciona ainda outras vantagens em relação às restantes abordagens de tipagem: por um lado requer dados de sequenciação, detetando mudanças ao nível do DNA que podem não ser aparentes por meio de abordagens fenotípicas; por outro lado, não requer acesso direto às estirpes isoladas ou ao DNA genómico de elevada qualidade (Maiden *et al*, 2006).

Desde então, o MLST tem vindo a ser aplicado a diferentes bactérias e organismos eucarióticos como ferramenta de análise epidemiológica, vigilância de patógenos, bem como à investigação da sua evolução e estrutura populacional (Maiden *et al*, 2006).

É um método que permite a caracterização de isolados microbianos por meio de sequenciação de fragmentos internos de genes conservados (*housekeeping genes*) (Maiden *et al*, 1998) e foi inicialmente concebido para estudos epidemiológicos globais e de vigilância (Urwin *et al*, 2003).

No caso de *H. influenzae* são sequenciados sete fragmentos (loci) de aproximadamente 500 pb (*adk* – 477 pb, *atpG* – 447 pb, *frdB* – 489 pb, *fucK* – 345 pb, *mdh* – 405 pb, *pgi* – 468 pb, e *recA* – 426 pb), sendo que a cada uma das sequências únicas é atribuído um número (Meats *et al*, 2003). À combinação dos sete números é atribuída um outro número designado por *sequence type* (ST).

A utilização destes sete números como unidade de análise vai ao encontro de alguns problemas associados ao uso de métodos filogenéticos para avaliação de relações entre estirpes isoladas e recombinantes. Estes problemas advêm do facto de que eventos individuais de recombinação, que são comuns, introduzem múltiplos polimorfismos, enquanto que mutações pontuais, fenómenos relativamente raros, apenas alteram nucleótidos individuais. Nos MLSTs, estas alterações têm o mesmo peso efetivo, uma vez que ambos representam uma mudança alélica. Um levantamento dos esquemas de MLST atualmente disponíveis revelou um impressionante nível de diversidade de perfis alélicos, que representam apenas uma fração do genoma em questão (normalmente menos de 0,2%), o que evidencia a importância da existência de um meio expansível de armazenamento e comparação de dados, tal como o são a definição numérica de alelos e de ST. Uma vez que as designações de alelo e ST são arbitrárias, podem ser agrupadas em ordens, à medida que a compreensão e conhecimento da diversidade de estruturas biológicas que estes catalogam aumenta, sem necessidade de revisão de nomenclatura.

Em muitas bactérias, os fenómenos de recombinação, transferência e transformação são evidentes uma vez que se verifica que o número de STs excede o número de alelos por *locus*. Não obstante, mesmo em organismos em que estes fenómenos ocorrem em elevada frequência, como é o caso de *H. influenzae*, o esquema de MLST é eficaz e é capaz de organizar as diferentes estirpes em complexos clonais. Ainda que a maioria dos STs observados num determinado conjunto de dados sejam raros e transitórios, alguns apresentam frequência elevada e estabilidade ao longo do tempo, e durante a sua propagação geográfica (Jolley & Maiden, 2014).

A clonalidade pode ser investigada por meio de um teste de congruência, que se baseia na observação de que, numa população clonal, o sinal filogenético observado em diferentes *loci* é o mesmo ou congruente. É possível racionalizar a estrutura do complexo clonal de muitas bactérias em termos do “modelo clonal epidémico” da estrutura populacional bacteriana ou das suas modificações (Maynard *et al*, 1993). Dentro deste modelo, uma elevada prevalência de um único ST indica a

presença da rápida disseminação de um novo clone, a partir do qual estão a surgir variantes. Na ausência de um meio formal de definição de clones, é necessária a implementação de uma definição racional de modo a suportar a comunidade científica que se encontre a analisar estas bactérias (Ibarz *et al*, 2009).

Para atribuição de complexos clonais e visualização das distâncias alélicas entre os STs obtidos, poderão ser utilizados vários algoritmos e plataformas.

O algoritmo BURST é rápido e eficaz e pode ser utilizado na atribuição de complexos clonais. O programa eBURST (Feil *et al*, 2004) agrupa os números ST, de acordo com os critérios definidos pelo utilizador, de entre um número de alelos em comum a pelo menos um outro membro do grupo (<http://eburst.mlst.net/>).

O programa PHYLOViZ foi desenhado com arquitetura aberta, em construção sob a implementação do goeBURST (disponível em <http://goeburst.phyloviz.net>), e permite a expansão dos tipos de dados que podem ser analisados, bem como de algoritmos, com o principal objetivo de integrar e dispor as diversas fontes de informação. O seu *software* permite ainda a integração de informação auxiliar que possa consistir em dados clínicos ou dados demográficos dos pacientes, ou ainda dados adicionais acerca do isolado, tais como resultados provenientes de métodos fenotípicos ou de tipagem genotípica (Francisco *et al*, 2012).

1.4 ANTIBIÓTICOS, SUSCETIBILIDADE E RESISTÊNCIA

Os antibióticos são substâncias químicas que visam inibir o crescimento dos microrganismos (ou mesmo provocar a sua morte), podendo estas ser produzidas pelo próprio microrganismo ou ser de origem sintética. Atuam seletivamente nas funções vitais do microrganismo, sem afetar as funções do hospedeiro.

Existem várias classificações para os antibióticos que se baseiam na sua estrutura química, no espectro bacteriano, tipo de atividade e mecanismo de ação, sendo que a mais utilizada baseia-se na estrutura química. O grupo dos antibióticos mais usados são os β -lactâmicos, nomeadamente ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefepime, cefotaxima, cefuroxima, cefaclor e meropenem, uma vez que a membrana externa de *H.influenzae* é bastante permeável a estes antibióticos. Este grupo composto por Penicilinas, Cefalosporinas e Carbapenemes, possuem um anel β -lactâmico em comum, e têm como alvo as proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Estes antibióticos funcionam como inibidores da síntese da parede celular do microrganismo. Os restantes antibióticos funcionam também como inibidores. As tetraciclina, os macrólidos (azitromicina) e o cloranfenicol funcionam como inibidores da síntese de proteínas, as sulfonamidas (trimetoprima/sulfametoxazol) atuam como inibidores do metabolismo do ácido fólico, e as quinolonas (ciprofloxacina) e a rifampicina são inibidoras da síntese de ácidos nucleicos (Resman, 2012).

A resistência desta bactéria aos antibióticos β -lactâmicos pode constituir sérias implicações a nível clínico, sendo que o uso inadequado dos antibióticos e a utilização de antibióticos de largo espectro tem contribuído para a emergência da resistência aos antibióticos (Bae *et al*, 2010).

Nesta espécie a resistência aos β -lactâmicos, e em concreto à ampicilina, caracteriza-se principalmente pela produção de β -lactamases, ou pela presença de PBPs modificadas, podendo mesmo haver estirpes com os dois tipos de mecanismos.

A produção de β -lactamases constitui o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos β -lactâmicos. As β -lactamases conferem resistência aos antibióticos através da hidrólise da ligação amina do anel β -lactâmico, levando à sua destruição (Wilke *et al*, 2005). Estas enzimas

podem ter uma origem plasmídica ou cromossômica e ser específicas para penicilinas (penicilases), cefalosporinas (cefalosporinases) ou mesmo possuir um largo espectro de atividade, inativando a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Este último grupo de β -lactamases é designado por β -lactamases de largo espectro (ESBLs) (Fluit *et al*, 2001; Tristram *et al*, 2007).

Em *H. influenzae*, existem 3 mecanismos de resistência descritos: resistência enzimática à ampicilina (com produção de β -lactamase), não enzimático, e mecanismo de resistência combinada.

Mecanismo de resistência enzimática (BLPAR – Resistência à ampicilina mediada por β -lactamases)

A β -lactamase produzida por estirpes de *H. influenzae* resistentes à ampicilina é uma enzima constitutiva semelhante às que são produzidas por outros organismos Gram-negativos, e é normalmente do tipo TEM (TEM-1 ou TEM-2, codificadas pelos genes *bla*_{TEM} de origem plasmídica) e raramente ROB-1 (que partilha homologia limitada com a enzima TEM) (Rubin *et al*, 1981; Karlowsky *et al*, 2000; Tristram *et al*, 2007).

A enzima TEM hidrolisa a penicilina e os derivados de penicilina, tais como ampicilina, carbenicilina e piperacilina. É também bastante ativa contra a cefuroxima, porém apresenta atividade insignificante contra cefotaxima, ceftazidima ou ceftriaxona (Tristram *et al*, 2007).

Mecanismo de resistência não enzimático à ampicilina (BLNAR)

H. influenzae possui um conjunto de 8 proteínas de ligação à penicilina (PBP) – 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 e 6 – com características de ligação para diferentes β -lactâmicos (Tristram *et al*, 2007). Alterações nestas proteínas, e essencialmente nas PBP3A e PBP3B, levam a uma diminuição da afinidade para os β -lactâmicos, o que causa um aumento na resistência da bactéria aos antibióticos β -lactâmicos. As estirpes BLNAR podem ainda apresentar suscetibilidade reduzida para as cefalosporinas (Tristram *et al*, 2007).

As estirpes BLNAR podem ser definidas genotipicamente (gBLNAR) de acordo com a sequenciação do gene *ftsI* e pelas substituições aminoacídicas da região da transpeptidase da PBP3, e em particular, pelas que se encontram próximo dos domínios conservados KTG, STVK e SSN. Baseado na presença destas substituições e no nível de resistência, Ubukata e os seus colaboradores dividiram as estirpes BLNAR em três grupos mutacionais: o grupo I caracterizado pela presença da substituição Arg517His, o grupo II com a substituição Asn526Lys e o grupo III caracterizado pela presença, em simultâneo, das substituições Met377Ile, Ser385Thr e Leu389Phe (Ubukata *et al*, 2001).

O facto de *H. influenzae* apresentar um sistema eficiente de “uptake” de DNA homólogo, torna possível a transferência do gene *ftsI* (mutado) de estirpes BLNAR para estirpes suscetíveis, por recombinação, (Tristram *et al*, 2007; Takahata *et al*, 2007), levando a uma rápida disseminação deste mecanismo de resistência.

Resistência combinada (BLPACR – Estirpes produtoras de β -lactamases resistente ao co-amoxiclave)

Designam-se por BLPACR as estirpes que combinam a produção de β -lactamases, com a existência de PBP3 modificadas (com substituições).

Estudos anteriores demonstraram que a diferença entre estirpes BLNAR e BLPACR, com substituições idênticas a nível da PBP3, é a concentração inibitória mínima (CIM) para a penicilina e ampicilina, que é mais elevada nas estirpes BLPACR, devido à expressão de β -lactamase (Ubukata *et al*, 2002; Tristram *et al*, 2007; Barbosa *et al*, 2011).

1.5 ESTRUTURA POPULACIONAL E EPIDEMIOLOGIA

Existem dois tipos de infeções associadas a *H. influenzae*, as invasivas e as não invasivas, que se distinguem pelos seus perfis epidemiológicos. Entre as infeções invasivas mais comuns, destacam-se a meningite e a septicemia. A pneumonia, pericardite, bacteriemia, epiglote, celulite e artrite séptica (Ulanova, 2013) são também consideradas como doenças invasivas.

As infeções das mucosas como a sinusite, otite média, bronquite e conjuntivite estão incluídas nas doenças consideradas não invasivas (Nizet *et al*, 1996; Gomez-de-Leon *et al*, 2000; CDC/NCIRD, 2012 [documento arquivado no site do CDC. Visualizado em Maio de 2017]).

Antes da introdução da vacina, *H. influenzae* do tipo b era considerado o responsável por cerca de três milhões de casos de infeções graves, com uma estimativa de 386 000 mortes por ano, devido a infeções como a meningite e pneumonia, sendo as vítimas essencialmente crianças com idades inferiores a 5 anos (Tristram *et al*, 2007).

Existem atualmente três tipos de vacinas conjugadas, sendo que as duas primeiras são administradas a crianças com 6 semanas de idade, e a terceira, a crianças com 12 ou mais meses de idade. Todas elas utilizam o mesmo princípio imunogénico, variando no tipo de proteína transportadora, método de conjugação química e dimensão polissacarídica. Estas vacinas têm demonstrado uma grande eficácia a nível global contra manifestações de infeção invasiva Hib, com uma estimativa de eficácia clínica de 95-100% (CDC/NCIRD, <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html>. Visualizado em Maio de 2017).

A vacina contra o Hib foi introduzida e licenciada em Portugal em 1994, primeiramente numa base voluntária, sendo depois efetivamente incluída no Programa Nacional de Vacinação (PNV) no ano de 2000.

Globalmente, antes da introdução da vacina contra *H. influenzae*, cerca de 90% dos casos por infeção invasiva eram fortemente associados a estirpes do serotipo b, e afetavam na sua maioria crianças com menos de 10 anos de idade. Com a introdução das vacinas conjugadas, a frequência das infeções por Hib diminuiu significativamente (2 a 3 casos por 100 000 crianças de idade inferior a 5 anos) nos países onde a vacina foi implementada e integrada no PNV (Ladhani *et al*, 2010; Davis, 2011). Em Portugal, a vacina foi opcional no período entre 1994 e 1999, e foi incluída no plano nacional de vacinação em 2000, onde também se verificou a diminuição no número de estirpes do serotipo b (de 81% para 16%) (Bajanca *et al*, 2004).

Atualmente, a maioria das doenças invasivas provocadas por *H. influenzae* são causadas por estirpes HiNC e de serótipo não-b, particularmente a e f, cuja prevalência tem vindo a aumentar consideravelmente. As estirpes do serotipo f, no entanto, apresentam uma epidemiologia mais

semelhante à das estirpes HiNC, enquanto que as do serotipo a apresentam uma capacidade para virulência semelhante à das estirpes do serotipo b. Há ainda a salientar que a idade dos pacientes com doença invasiva, também sofreu alterações com a introdução da vacina. O grupo etário mais afetado eram as crianças (menores de 5 anos), sendo que após a introdução da vacina, passaram a ser os adultos os mais atingidos (sobretudo idosos a partir dos 65 anos) (Ulanova & Tsang, 2009; Ladhani *et al*, 2010; Ulanova, 2013). Num estudo realizado em Portugal por Bajanca-Lavado e colaboradores, que abrangeu o período pós-vacina entre 2002 e 2010, foi verificado que a maioria das estirpes eram HiNC e foram isoladas em adultos. Estirpes capsuladas foram isoladas em crianças e adultos, mas as crianças com doença causada por estirpes do serotipo b tinham idade inferior a 2 anos (Bajanca-Lavado *et al*, 2014).

No final de 2015, a vacina do Hib tinha já sido introduzida em 191 países. A estimativa para a abrangência global das 3 doses de vacina é de 64%, sendo que existem diferenças significativas entre regiões. Na América, a abrangência é de 90%, enquanto que nas regiões do oeste do Pacífico é de apenas 25%. Em locais sobrepovoados, como é o caso dos do este da Ásia, só cerca de 56% da população está abrangida pela vacinação (Figura 1.5.1.) (WHO, Março de 2017; Visualizado em Junho de 2017).

Os planos de vacinação atuais poderão, contudo, apresentar um problema no futuro, uma vez que são apenas dirigidos às estirpes capsuladas do serotipo b, e não abrangem as restantes estirpes capsuladas nem as HiNC.

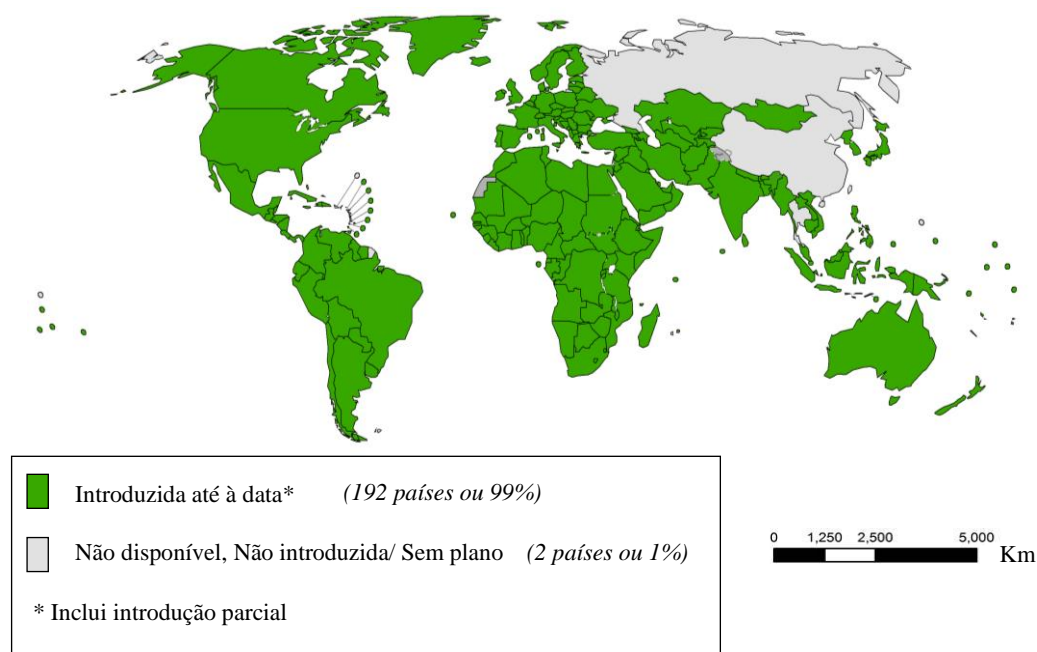


Figura 1.5.1. Países onde a vacina contra o Hib foi introduzida no Programa Nacional de Vacinação. A 16 de Dezembro de 2016, 192 países tinham introduzido (total ou parcialmente) a vacina do Hib no seu plano nacional (Dados da WHO/IVB, 2017; Adaptado)

1.6 PATOGÊNESE E MECANISMO DE INVASÃO

Após a introdução da vacina para o Hib, verificou-se uma alteração dos serotipos responsáveis pela infecção invasiva, sendo agora as estirpes HiNC as principais responsáveis por este tipo de infecção (De Carvalho *et al*, 2011; Ladhani *et al*, 2012). Como referido no capítulo anterior, a frequência das infecções pelos serotipos a, e, e f tem também vindo a aumentar, ainda que em menor número que as por HiNC (Langereis, 2015).

As estirpes HiNC, não possuindo cápsula (principal fator de virulência), necessitam de outros fatores, que permitam e auxiliem no processo de aderência e invasão às células do hospedeiro, e que impeçam a ligação por parte dos fatores do sistema imunitário.

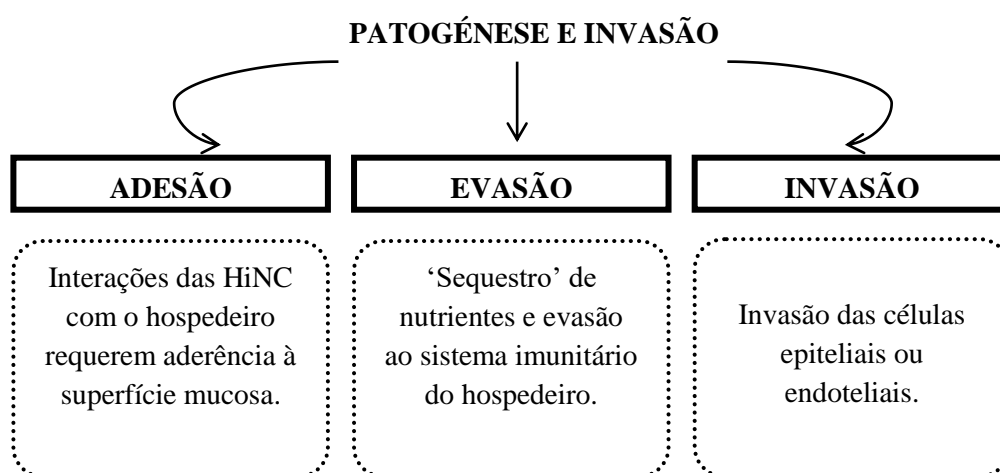


Figura 1.6.1. Representação esquemática do processo de patogênese em *Haemophilus influenzae*. A patogênese pode ser dividida nas 3 fases indicadas.

O passo inicial passa pela incorporação das proteínas de membrana externa das bactérias, cujo alvo são as células do hospedeiro. Para as estirpes HiNC, este passo envolve a aderência da bactéria à superfície mucosa, responsável pela eliminação da maioria das bactérias inaladas. Após este passo poderá ainda ocorrer uma segunda invasão celular, para garantir que as células são infetadas (Read *et al*, 1991; Rao *et al*, 1999; Duell, 2016).

As proteínas HMW1 e HMW2 (*High Molecular Weight*), bem como a Hia (do inglês, *H. influenzae adhesin*) são particularmente importantes para a colonização e são capazes de mediar a sua expressão, alternando entre ativas e inativas (variação de fase) (St Geme III *et al*, 1993; Attack *et al*, 2015). Recentemente, foi descoberto que a atividade da adesina Hia é significativamente superior (*upregulation*) durante a infecção por HiNC de uma célula primária polarizada bem diferenciada do epitélio bronquial humano (wd-NHBE), num modelo de cultura celular (Baddal *et al*, 2015). A HMW1 e a HMW2 têm ainda um papel adicional, uma vez que têm a capacidade de se ligar a proteoglicanos, na matriz extracelular (ECM) (Noel *et al*, 1994). Os efeitos desta glicosilação têm diversas implicações na estrutura da superfície celular e das proteínas da ECM (Spiro, 2002).

O autotransportador Hap (do inglês, *Haemophilus adhesion protein*) é também importante na ligação às células epiteliais (nas estirpes HiNC), através da ligação a 3 componentes – laminina

(ligação é feita em conjunto com a proteína E), fibronectina e colagénio IV (Fink *et al*, 2003; Hallstrom *et al*, 2011).

As porinas P2 e P5 (determinante de virulência nas estirpes HiNC), são capazes de se ligar à mucina (Reddy *et al*, 1996; Puig, 2015). Esta capacidade sugere uma estratégia de sobrevivência, como resultado da não existência de cápsula.

Os pili estão presentes nas estirpes capsuladas e nas estirpes HiNC, e ligam-se à mucina (Kubiet *et al*, 2000). A proteína pilA liga a ICAM1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) à superfície do epitélio celular, tal como evidenciado por um estudo recente (Novotny, 2016).

O aumento na quantidade de ICAM1 no meio (*upregulation*) ocorre também durante o processo de infeção viral, o que sustenta a hipótese de as estirpes HiNC adaptarem a expressão das suas proteínas de membrana.

O passo seguinte é a entrada da bactéria no hospedeiro.

A proteína D é uma lipoproteína de superfície altamente conservada e que é crucial para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Ruan *et al*, 1990; Puig, 2015).

O lipooligossacárido (LOS) – presente na membrana exterior das estirpes HiNC – é também importante neste passo, uma vez que é um mediador da entrada nas células do hospedeiro, causando remodelação do citoesqueleto. Pequenas modificações no LOS levam a várias situações possíveis, nomeadamente à capacidade que as estirpes não capsuladas têm de moderar a sua virulência (Swords *et al*, 2001).

A par com os padrões de glicosilação, estas modificações representam uma parte importante da capacidade que as estirpes HiNC têm de alterar/moderar os seus fatores de virulência (Swords *et al*, 2001).

Após a entrada nas células do hospedeiro, a sobrevivência da bactéria passa por adquirir os nutrientes e metabolitos necessários ao seu crescimento e regulação das funções celulares, o que depende de várias proteínas (Morey *et al*, 2013).

As proteínas reguladoras Fur (*Ferric uptake regulator*), que capturam Ferro, e a expressão de um mecanismo mediado pelas proteínas Tbp1 e Tbp2 (*Transferrin binding protein*), que incorporam Ferro ligado à transferrina, têm especial importância, uma vez que permitem a aquisição de 2 componentes que a bactéria é incapaz de sintetizar – hemina e NAD (Rao *et al*, 1999; Harrison *et al*, 2013; Duell *et al*, 2016).

As estirpes HiNC possuem ainda uma série de fatores que lhes permite a evasão ao sistema complemento ou a inativação de algumas partes do sistema imunitário do hospedeiro, responsáveis pela resposta à invasão.

As vesículas de membrana externa (OMV) representam um passo intermediário importante a nível das interações entre a bactéria e o sistema imunitário do hospedeiro (têm capacidade para estimular uma série de respostas de largo-espectro). A perda destas vesículas poderá ainda trazer benefícios, pois se por um lado as OMVs desencadeiam uma série de respostas complexas que auxiliam no processo de colonização e conferem virulência, por outro lado, isso irá alertar o sistema imunitário acerca da presença da bactéria (Schwechheimer *et al*, 2015; Kaparakis-Liaskos *et al*, 2015).

As porinas da membrana externa de *H. influenzae* como a P2, P5 e P6 atuam no esquema de evasão ao sistema complemento do sistema imunitário do hospedeiro.

A P2 e a P5 desempenham funções na aderência ao epitélio mucoso, mas ligam-se ainda à mucina, o que confere uma proteção contra as respostas inflamatórias. A P5 pode ainda ligar-se ao fator humano H, impedindo assim a deposição do complemento C3 (Langereis *et al*, 2014; Rosadini *et al*, 2014).

A P6 poderá ainda ter um mecanismo extra, como modo de evasão ao mecanismo de reconhecimento das HiNC, através do qual modifica a sua orientação na membrana externa (Michel *et al*, 2013).

Devido a estas características, tanto a P2 como a P6 têm sido investigadas como potenciais candidatos para uma vacina contra as estirpes HiNC. Para além disto, a proteína P2 constitui mais de 50% das proteínas OMV (Rahman, 2009).

Modificações na estrutura oligossacárida do LOS atenuam ainda o recrutamento de células (macrófagos) por parte do sistema imunitário e afetam o controlo da inflamação no local da infeção (Choi *et al*, 2014). Por exemplo, a fosforilcolina modula a membrana externa, protegendo contra a imunoglobulina G (IgG) e os efeitos da ativação do sistema complemento (Langereis *et al*, 2014).

Existem diversos mecanismos que tentam explicar o processo de invasão das células epiteliais ou endoteliais por parte das HiNC, contudo, o papel de alguns mecanismos permanece ainda por explicar. Alguns destes mecanismos incluem a fagocitose de monócitos e macrófagos (Ketterer *et al*, 1999), endocitose, transcitose ou paracitose, envolvendo acumulação lipídica (*lipid raft*) ou clatrina (Clementi *et al*, 2011).

De modo a causar doenças graves como a meningite, septicémia ou pneumonia, *H. influenzae* necessita de invadir as barreiras sangue/cérebro e sangue/pulmões. Estudos anteriores demonstraram já que *H. influenzae* consegue passar através de uma monocamada de células endoteliais, por meio de disrupção das *tight junctions* (Patrick *et al*, 1992; Tunkel *et al*, 1992; Puig, 2015).

1.7 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA

As estirpes HiNC apresentam uma elevada diversidade genética. Deste modo, alguns dos genes abordados no segmento anterior não estão presentes em todos os isolados que causam infeção invasiva, além de que existem ainda vários fenómenos de variação genética (Erwin & Smith., 2007). Estes fenómenos poderão consistir em transformações, transferência horizontal de genes, elevada frequência de polimorfismos (mutações pontuais, inserções, deleções, duplicações), hipermutabilidade, e variação de fase (Garmendia *et al*, 2012), o que permite a rápida adaptação da população bacteriana, face a oscilações nas condições do meio (Mell *et al*, 2011).

Em concreto, os eventos de variação de fase em *H. influenzae* são um dos mecanismos mais importantes e que contribuem para o aumento da variabilidade genética. A variação de fase é um mecanismo que acontece com elevada frequência e que é reversível, facilitando assim a adaptação ao ambiente (Moxon *et al*, 2006). É mediada por pequenas repetições de DNA (*simple sequence repeats* –SSR), localizadas na região do promotor (do gene) ou contidas em *open reading frames* (ORF) (Power *et al*, 2009).

Foram já descritos diferentes mecanismos de variação de fase, que resultam em diferentes fenótipos, e incluem genes relevantes, como o LOS, as pili hemaglutinantes, e o *hmw1/hmw2*. Sabe-se ainda que as proteínas HMW1A/2A, *hifA* e *hia* são adesinas de superfície altamente imunogénicas (para as estirpes HiNC), pelo que o estudo da sua presença/ausência, em conjunto com o estudo da expressão da proteína e os dados clínicos do paciente, poderão ser úteis na caracterização da doença invasiva.

Neste trabalho, foram estudados 6 determinantes de virulência para as estirpes causadoras de doença invasiva – *ompP5*, *pilA*, *hmw1A*, *hmw2A*, *hifA*, e *hia*.

Segue-se uma breve introdução a cada um dos genes, e no final, uma tabela (Tabela 1.7.1), que sumariza as principais características – Função do gene, em que tipo de estirpes é normalmente encontrado, nível de conservação, e a percentagem esperada (presença do gene), tendo em conta a bibliografia.

ompP5

As proteínas de membrana externa (OMP) são compostas por vários tipos de proteínas, sendo a P2 uma das mais importantes, uma vez que representa cerca mais de 50% das OMPs. A P2, bem como a P6, têm vindo a ser investigadas pelo seu potencial como antígenos (para fabrico de uma vacina) (Rahman, 2009).

A P5 tem um papel na resistência das estirpes HiNC ao sistema complemento (Rosadini *et al*, 2014), e contribui para a aderência às células do hospedeiro, apesar de não ser essencial. No entanto, e como demonstrado por Vuong e colaboradores, a P5 encontra-se normalmente presente em isolados que não possuem o gene *hmw1/2*, importante para a aderência das estirpes HiNC (Vuong *et al*, 2013). Duim e colaboradores, tinham anteriormente estudado a P5, e reportado uma menor frequência na presença do gene (Duim *et al*, 1997). Verifica-se que, apesar de a maioria das estirpes possuir este gene, existe alguma regulação ao nível da transcrição (Vuong *et al*, 2013).

pilA

O pilus de Tipo IV (Tfp) desempenha um papel importante nas estirpes HiNC, nomeadamente na aderência às células do hospedeiro e formação de biofilme. O gene *pilA* pertence ao *cluster pilABCD*. Este *cluster* apresenta algum grau de homologia com o *cluster comABCDEFG*, e são os mais relevantes a nível de fenótipos associados ao Tfp (Bakaletz *et al*, 2005; Jurcisek *et al*, 2007).

pilA foi inicialmente proposto como sendo a subunidade principal, o que foi mais tarde provado através de testes de espectrometria de massa (Carruthers *et al*, 2012; Kolappan *et al*, 2012).

hmw1A/2A

As proteínas HMW1 e HMW2 são codificadas por 2 *loci* distintos. Cada um deles contém 3 genes – *hmwA* (codifica a proteína estrutural), *hmwB* e *hmwC*. Assim, as 2 adesinas exibem diferentes características de ligação às células do hospedeiro. As sequências destes genes apresentam homologia apenas nos primeiros 1 259 pb, ponto a partir do qual a percentagem de dissimilaridade poderá ser de 58% (Barenkamp *et al*, 1992; St Geme III *et al*, 1994; St Geme III *et al*, 2009).

Estas adesinas são ainda uma das possíveis candidatas para uma vacina contra as estirpes HiNC (Giufre *et al*, 2008), tal como a P2 e P6.

hifA

O gene *hifA* codifica para uma subunidade das fímbrias, responsável por mediar o recetor gangliosídeo. Pode estar presente nas estirpes HiNC, bem como nas estirpes capsuladas do serotipo b. É também um gene contido num *cluster* (*hifABCDE*), cuja transcrição depende de um número reversível de repetições TA, na zona do promotor, entre os genes *hifA* e *hifB* (Gilsdorf *et al*, 1997; Geluk *et al*, 1998; Gilsdorf *et al*, 2004).

hia

A *hia* é um tipo de fímbria (proteína) de elevado peso molecular, que pode estar presente em estirpes HiNC, quando estas não expressam HMW1A/2A. Em estudos que utilizam um pequeno grupo de isolados, foi reportada uma distribuição não proporcional entre estirpes que apresentam estes genes (Erwin *et al*, 2005; Cardines *et al*, 2007; Winter *et al*, 2014).

A adesina Hsf é uma proteína homóloga da *hia*, e está presente em estirpes capsuladas. Ambas têm a função de facilitar na aderência da bactéria ao hospedeiro (Rahman, 2009).

Tabela 1.7.1. Sumário das características principais dos 6 genes de virulência estudados – *pilA*, *ompP5*, *hifA*, *hmw1A/2A*, e *hia*.

Fator de virulência	Estirpes	Função	Conservação (em relação aos primers)	% (Presença do gene)
<i>pilA</i>	HiNC + Capsuladas	Aderência e formação de biofilme	Conservado	~98%
<i>ompP5</i>	HiNC + Capsuladas	Intervém na ligação à mucina, ICAM-1 e CEACAM-1	Conservado mas com regulação (AGGA)	50% ~ 100%
<i>hifA</i>	HiNC + Hib	Intervém na ligação ao recetor gangliosídeo	Não Conservado; Mononucleótido SSR ~95 pb (T)9 ; Dinucleótido SSR (TA)9-11 na região do promotor	30% ~ 40%
<i>hmw1A</i>	HiNC	Promove a aderência ao epitélio humano e facilita a colonização; inicia o processo de patogénese	Conservado apenas em algumas zonas; Apresenta Variação de Fase: 2	66% ~ 80%
<i>hmw2A</i>	HiNC		heptanucleótidos SSRs ~100 pb upstream do gene (TGAAAGA)	66% ~ 80%
<i>hia</i>	HiNC	Facilitam a aderência às células do epitélio do hospedeiro	Apresenta Domínios Conservados; Pode ter (T)34 ~110 pb upstream; Pode ter deleção a.a. 2-49	~25%

Para cada um dos fatores de virulência é descrita a sua função, em que tipo de estirpes se encontram presentes, o seu grau de conservação/variação e a percentagem de estirpes que apresentam o gene.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra em estudo incluiu um grupo de **174 estirpes clínicas invasivas** de *Haemophilus influenzae*, produtoras e não produtoras de β -lactamase, pertencentes à coleção do Laboratório Nacional de Referência de *Haemophilus influenzae*, do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em Lisboa.

As amostras foram provenientes de **32 centros e laboratórios hospitalares em Portugal** (continental e ilhas), e isoladas entre Janeiro de 2011 e Dezembro de 2016, inclusive.

A amostra foi caracterizada com base na recolha de dados demográficos (género e idade, por exemplo), assim como em outros dados laboratoriais, como tipo de infeção, data de isolamento e diagnóstico, quando disponíveis.

As estirpes foram isoladas de indivíduos de ambos os géneros, com idades compreendidas entre 1 dia e os 92 anos, de produtos biológicos considerados estéreis (sangue, líquido-cefaloraquidiano, entre outros), e que originaram doença invasiva, como indicado nas Tabela 2.1.1 e Tabela 2.1.2..

Salienta-se que esta amostra já estava parcialmente caracterizada relativamente ao serotipo, suscetibilidade aos antibióticos e tipagem por MLST.

Tabela 2.1.1. Caracterização das estirpes clínicas invasivas de *Haemophilus influenzae*, isoladas em Portugal, entre 2011 e 2016, tendo em conta a origem do produto biológico, o género, o grupo etário ao qual os indivíduos pertencem e a localização geográfica dos hospitais que providenciaram as amostras.

Características	n (%)
Produto Biológico	
Sangue	150 (86,2)
Líquido Cefalorraquidiano	15 (8,62)
Abcesso Cervical	1 (0,57)
Líquido Articular	3 (1,72)
Líquido Pleural	4 (2,30)
Líquido Ascítico	1 (0,57)
Género	
Masculino	107 (61,49)
Feminino	67 (38,51)
Grupo etário	
< 1	26 (14,9)
1 – 5	15 (8,62)
6 – 19	10 (5,75)
20 – 59	42 (24,1)
60 – 79	49 (28,2)
≥ 80	32 (18,4)
Localização	
Norte	48 (27,6)
Algarve	2 (1,15)
Centro	14 (8,05)
Área Metropolitana de Lisboa	92 (52,9)
Alentejo	3 (1,72)
Região Autónoma dos Açores	0 (0)
Região Autónoma da Madeira	13 (7,47)
Desconhecido	2 (1,15)
TOTAL	n = 174

Foram considerados os produtos biológicos relevantes para o estudo da doença invasiva. Foi calculada a percentagem de indivíduos do género ‘Masculino’ e ‘Feminino’, no total das 174 amostras. Foram considerados 6 grupos etários. Foram utilizados os critérios das NUTS II para a localização dos hospitais.

Tabela 2.1.2. Origem das estirpes clínicas invasivas de *Haemophilus influenzae*, isoladas em Portugal, entre os anos de 2011 e 2016.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL
Sangue	19	15	26	30	27	33	150
LCR	3	4	2	-	3	3	15
Abcesso Cervical	-	-	-	-	-	1	1
Líquido Articular	-	1	1	-	1	-	3
Líquido Pleural	-	2	-	2	-	-	4
Líquido Ascítico	-	1	-	-	-	-	1
TOTAL	22	23	29	32	31	37	174

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

2.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA

Todas as estirpes foram semeadas em gelose chocolate com PolyViteX (bioMérieux, Linda-a-Velha, Portugal) e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 , o.n. (*overnight*). Após verificação da pureza e viabilidade da cultura, foram congeladas a -80°C .

A extração do DNA bacteriano foi realizada pelo método da lise por fervura.

Cinco ou seis colónias da estirpe foram ressuspensas em 100 μl de água bidestilada estéril, livre de DNases e RNases e fervidas em banho-maria durante 10 minutos, utilizando uma placa de aquecimento (IKA-Werke GmbH & CO Kg MEC2P, Carnaxide, Portugal). Após a fervura, o DNA foi separado dos restantes constituintes celulares por meio de uma centrifugação, a 13 000 rpm, durante 3 minutos, à temperatura ambiente (Eppendorf, Carnaxide, Portugal). Após centrifugação, foram transferidos entre 80 a 90 μl de sobrenadante (contendo o DNA) para um novo tubo *ependorf*, devidamente identificado com o número da estirpe.

O DNA extraído foi armazenado a -20°C .

2.3 PESQUISA DA PRODUÇÃO DE β -LACTAMASE

A produção de β -lactamase foi pesquisada por meio de um teste cromogénico, que utiliza o Nitrocefina (Oxoid Ltd, Hampshire, Inglaterra), uma cefalosporina, como substrato.

O teste tem como princípio uma reação colorimétrica, que ocorre quando, em contacto com uma estirpe produtora de β -lactamase, o nitrocefina passa de amarelo a vermelho, indicando assim a destruição do seu anel β -lactâmico (O'Callaghan *et al*, 1972).

Efetua-se a suspensão de cinco a seis colónias de cada estirpe em 30 μl de nitrocefina, numa placa de microdiluição, e após alguns minutos, registou-se o resultado da reação colorimétrica.

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A suscetibilidade aos antibióticos em *H. influenzae* foi determinada pelo método da microdiluição em placa, utilizando as normas mais recentes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2017; http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Visualizado em Abril de 2017).

Em condições de assepsia, quatro a cinco colónias foram ressuspensas em frascos com 3 ml de água autoclavada e desionizada (Beckman Coulter, Dade Behring Inc, West Sacramento, EUA). A suspensão foi vortexada (IKA-Werke GmbH & CO Kg MEC2P, Carnaxide, Portugal), e verificou-se se o seu padrão de turvação era equivalente ao padrão de turvação *standard* 0,5 de McFarland.

Posteriormente, inocularam-se 100 µl dessa suspensão em 25 ml de meio de crescimento *Haemophilus Test Medium Broth* (HTM Beckman Coulter [10 x 25 ml] B1015-26, Dade Behring Inc, West Sacramento, EUA). O inóculo foi em seguida distribuído na placa MICroSTREP plus® tipo 3 (Dade Behring Inc, West Sacramento, EUA), com o auxílio de um inoculador (RENOK). As placas foram incubadas a 35°C ± 2°C, *overnight*, numa atmosfera sem CO₂.

A leitura das placas foi feita por observação da turbidez de cada poço, incluindo dos poços de controlo.

Efetuiu-se o registo da CIM (mg/L) para cada um dos 13 antibióticos estudados (amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, azitromicina, cefaclor, cefepime, cefotaxima, cefuroxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, meropenem, rifampicina, tetraciclina e trimetoprima-sulfametoxazol).

As estirpes foram classificadas de acordo com as diferentes categorias de suscetibilidade, utilizando os *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST.

Tabela 2.4.1. Categorias de suscetibilidade, CIM (mg/L), para *H. influenzae*, de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST 2017 (13 antibióticos).

Categorias de suscetibilidade / Breakpoints (mg/L)					
Agente Antimicrobiano	Abreviatura	Sensível		Resistente	
Amoxicilina/Ácido clavulânico	Amc	≤ 2		> 2	
Ampicilina	Amp	≤ 1		> 1	
Azitromicina	Azi	≤ 0,125		> 4	
Cefaclor	Cfr	-		-	
Cefepime	Cpe	≤ 0,25		> 0,25	
Cefotaxima	Cft	≤ 0,125		> 0,125	
Cefuroxima	Crm	Iv	≤ 1	Iv	> 2
		Oral	≤ 0,125	Oral	> 1
Cloranfenicol	C	≤ 2		> 2	
Ciprofloxacina	Cp	≤ 0,06		> 0,06	
Meropenem	Mer	Meningite	≤ 0,25	Meningite	> 1
		Outros	≤ 2	Outros	> 2
Rifampicina	Rif	≤ 1		> 1	
Tetraciclina	Te	≤ 1		> 2	
Trimetoprima/Sulfametoxazol	SXT	≤ 0,5		> 1	

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017. <http://www.eucast.org>

2.5 DETECÇÃO DA CÁPSULA E DETERMINAÇÃO DO SEROTIPO CAPSULAR

A presença de cápsula nas estirpes de *H. influenzae* foi determinada pela amplificação por PCR, de um fragmento interno do gene *bexA*, localizado na região I do *locus cap*, com 343 pb. No caso das estirpes não capsuladas, por não estar presente o gene *bexA*, não ocorre amplificação.

A mistura reacional (25 µl) para uma reação (1x) era constituída por 2,5 µl de tampão 10x (Bioline), 2,5 µl de dNTPs 10 mM (mix composta por dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 2,5 mM cada) (Roche Diagnostics GmbH), 0,4 µl de cada *primer* específico (10 mM) para a amplificação do gene *bexA* (Eurogentec, Seraing, Bélgica), descritos por Falla *et al*, 1994, 1,75 µl de MgCl₂ 25 mM (*Qiagen, Alemanha*) e 0,1 µl de Taq polimerase (*Qiagen, Alemanha*).

À mistura reacional com volume final de 23,5 µl, adicionou-se 1,5 µl de DNA.

No Anexo I, encontra-se uma tabela com a lista e sequência dos *primers* utilizados na detecção e amplificação da região específica da cápsula.

A reação de amplificação foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa de amplificação: um ciclo de pré-desnaturação a 94°C, durante 5 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto (desnaturação), 55°C durante 1 minuto (*annealing*) e 72°C durante 1 minuto (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

A análise do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose (Lonza, Rockland, ME, USA) a 2% (p/v), em tampão Tris-borato-EDTA (TBE 1x), a 100V, durante 30 minutos.

Para o gel, adicionaram-se 100 ml de tampão TBE 1x a 2 g de agarose, e dissolveu-se no microondas. Adicionaram-se 5 µl de Sybr safe (400µl 10 000x em DMSO) (Invitrogen, USA) à agarose, para visualização das bandas.

Em cada poço foram colocados 5 µl de produto de PCR amplificado e 2 µl de azul de bromofenol. Foram utilizados 3 µl do marcador molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH), com bandas entre os 1114 pb e os 19 pb.

Os resultados foram fotografados com o Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

Para a caracterização do serotipo foram utilizados *primers* específicos (Falla *et al*, 1994) de cada um dos 6 serotipos capsulares descritos (a-f).

A mistura reacional e o programa de amplificação utilizados para o PCR de determinação do serotipo capsular são idênticos aos descritos para o PCR de pesquisa de cápsula.

A análise do produto amplificado foi feita do mesmo modo anteriormente descrito para a pesquisa de cápsula.

2.6 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

Foram caracterizadas por MLST 136 estirpes, escolhidas de acordo com os seguintes critérios: todas as estirpes isoladas de crianças, todas as estirpes capsuladas (à exceção de duas estirpes, por não estarem viáveis), e uma amostra de estirpes isoladas de adultos, principalmente nos últimos anos do estudo.

A genotipagem dos isolados de *H. influenzae* em estudo foi realizada pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

Foram utilizados *primers* específicos para a amplificação de cada um dos 7 fragmentos internos conservados (*housekeeping genes*), e de acordo com a técnica descrita por Meats *et al*, 2003: *adk*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi* e *recA*.

No Anexo II, encontra-se uma tabela com os *primers* utilizados para a amplificação da região específica dos 7 genes.

As 7 misturas reacionais de 25 µl eram constituídas por 1 µl de cada um dos *primers* específicos para a amplificação dos 7 genes, a 20 mM, nas direções *forward* e *reverse*, e 12,5 µl de HotStar Taq Master Mix (Qiagen, Alemanha). Adicionaram-se 5 µl de DNA aos 20 µl de cada uma das 7 misturas reacionais.

A amplificação dos 7 fragmentos foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa de amplificação: um ciclo de pré-desnaturação a 95°C durante 15 minutos, seguidos de 34 ciclos de 95°C durante 30 segundos (desnaturação), 55°C durante 30 segundos (*annealing*) e 72°C durante 1 minuto (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

A purificação dos produtos amplificados por PCR foi efetuada com o reagente ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, EUA), que tem como função a remoção do excesso de *primers* e dNTPs do produto de PCR. Adicionaram-se 3 µl de ExoSAP-IT a 5 µl de produto amplificado por PCR.

A reação de purificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa: um ciclo a 37°C durante 15 minutos e um ciclo de 80°C durante 15 minutos, para inativação da enzima.

A análise do DNA purificado foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a pesquisa de cápsula, e utilizando o marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH).

De acordo com a intensidade das bandas observada no gel de agarose decidiu-se a quantidade a utilizar na reação de sequenciação.

A reação de sequenciação foi realizada num volume final de 10 µl (mistura reacional + DNA purificado).

A mistura reacional para 7 amostras, i.e., os 7 alelos de uma única estirpe, era composta por 22,4 µl de tampão Big Dye 5x, 5,6 µl de Big Dye e 7 µl de *primer* M13F, a 20 mM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Aos 9 µl da mistura reacional adicionou-se 1 µl de DNA purificado.

Para a sequenciação de cada gene foi apenas utilizado o *primer forward*.

A reação de sequenciação foi efetuada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa: um ciclo de pré-desnaturação a 96°C durante 1 minuto, seguidos de 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos (desnaturação), 50°C durante 5 segundos (*annealing*) e 60°C durante 3 minutos e 30 segundos (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

As sequências foram determinadas no sequenciador automático ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Lisboa, Portugal).

Os cromatogramas foram analisados com o programa Finch TV, versão 1.4.0 (Geospiza Inc.) e exportados para formato FASTA. A análise das sequências obtidas por MLST foi feita através do site de MLSTs de *H. influenzae*, que se encontra disponível em <http://pubmlst.org/hinfluenzae/>, e que utiliza 2 bases de dados interligadas através da plataforma BIGSdb genomics.

As sequências FASTA dos 7 alelos de cada isolado foram submetidas à base de dados para atribuição do *Sequence type* (ST).

A plataforma PHYLOViZ foi utilizada para exibir as distâncias alélicas entre os STs obtidos, através da análise pelo algoritmo goeBURST.

2.7 DETECÇÃO DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA

As técnicas aqui apresentadas foram implementadas durante este estudo.

Uma vez que não foi possível estudar todas as 174 estirpes, foi utilizado o seguinte critério: verificar a presença/ausência dos genes em estirpes isoladas mais recentemente, tendo em conta se era uma estirpe capsulada ou HiNC, os resultados obtidos neste estudo e por outros investigadores (Geluk *et al*, 1998; Cardines *et al*, 2007; Vuong *et al*, 2013).

A presença ou ausência dos genes *pilA*, *ompP5*, *hmw1A/2A*, *hifA*, e *hia* foi determinada pela amplificação por PCR de fragmentos dos genes com os respetivos tamanhos: 416 pb, 1040 pb, 140 pb, 199 pb, 810 pb e 3259 pb.

Os detalhes acerca dos *primers* e controlos específicos utilizados para cada um dos ensaios encontram-se compilados nos Anexos III e IV.

Mistura reacional

A mistura reacional para uma reação (1x), para amplificação de cada um dos genes de virulência, foi realizada num volume final de 25 µl, constituída por: 2,5 µl de tampão (10x) (específico de cada enzima), 2 µl de dNTPs a 10 mM (mix composta por dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 2,5 mM cada) (Takara), 2,5 µl de cada *primer* específico, a 20 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (Qiagen, Alemanha) e 0,2 µl da enzima. À mistura reacional com volume final de 23 µl, adicionaram-se 2 µl de DNA.

As enzimas utilizadas foram a GOTaq polimerase (Qiagen, Alemanha) para os genes *pilA* e *hmw1A/2A*, a Bio X-Act Short (Qiagen, Alemanha) para os genes *ompP5* e *hifA*, e a TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase (Takara) para o gene *hia*.

Programa de amplificação

A reação de amplificação foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB) de acordo com os seguintes programas modificados a partir dos protocolos descritos por Cardines e colaboradores (Cardines *et al*, 2007) e por Vuong e colaboradores (Vuong *et al*, 2013):

Para o gene *pilA*: um ciclo de pré-desnaturação a 94°C, durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto (desnaturação), 53°C durante 1 minuto (*annealing*) e 72°C durante 5 minutos (extensão), e um ciclo de 72°C durante 5 minutos (extensão final).

Para o gene *ompP5*: um ciclo de pré-desnaturação a 94°C, durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturação), 51°C durante 30 segundos (*annealing*) e 72°C durante 2 minutos (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

Para os genes *hmw1A/2A*: um ciclo de pré-desnaturação a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto (desnaturação), 50°C durante 30 segundos (*annealing*) e 72°C durante 1 minutos (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

Para o gene *hifA*: um ciclo de pré-desnaturação a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos (desnaturação), 50°C durante 30 segundos (annealing) e 72°C durante 1 minuto (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

Para o gene *hia*: um ciclo de pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto (desnaturação), 53°C durante 1 minuto (*annealing*) e 72°C durante 5 minutos (extensão), e um ciclo de 72°C durante 10 minutos (extensão final).

Eletroforese em gel de agarose

A análise do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose (Lonza, Rockland, USA) a 2% (p/v), em tampão Tris-borato-EDTA (TBE 1x), a 100V, durante 30 minutos. Para o gene *hia*, por ser um fragmento de elevado peso molecular (3259 pb), o gel utilizado foi de 1% (p/v).

Para o gel (2% (p/v)), adicionaram-se 100 ml de tampão TBE 1x a 2 g de agarose, e dissolveu-se no microondas. Adicionaram-se 5 µl de Sybr safe à agarose ainda quente, para visualização das bandas.

Em cada poço foram colocados 7 µl de produto de PCR amplificado e 3 µl de azul de bromofenol. Foram utilizados 3 µl do marcador molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH), com bandas entre os 1114 pb e os 19 pb. Para o gene *hia*, foram utilizados 3 µl do marcador molecular VII (Roche Diagnostics GmbH), com bandas entre (359-8576 kb).

Os resultados foram fotografados com o Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

3. RESULTADOS

3.1 PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DA CÁPSULA

Foram estudadas 174 estirpes isoladas de doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*, provenientes de 32 centros e laboratórios hospitalares em Portugal, recebidas no Laboratório Nacional de Referência de *Haemophilus influenzae*, do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em Lisboa, entre Janeiro de 2011 e Dezembro de 2016, inclusive.

A população com doença invasiva a *H. influenzae* foi caracterizada com base na recolha de dados demográficos e outros dados laboratoriais, quando disponíveis, e foi já sumarizada anteriormente (Materiais e Métodos, Tabela 2.1.1).

No conjunto de doentes estudados verificámos que a frequência dos casos de doença invasiva foi superior em indivíduos com 65 ou mais anos (n=78), relativamente à frequência em indivíduos com idades compreendidas entre os 18 anos e os 64 anos (n=51).

As idades dos pacientes variaram entre recém-nascido e 92 anos, com uma média de idades de 48 anos.

Após os 65 anos, a frequência da doença foi ligeiramente superior em pacientes do sexo masculino (n=37; n=31, em pacientes do sexo feminino). Entre os 18 anos e os 64 anos (inclusive), a frequência também foi superior no sexo masculino (n=33; n=18 em pacientes do género feminino). A Figura 3.1.1. relaciona os grupos etários com o género do paciente de onde proveio o isolado.

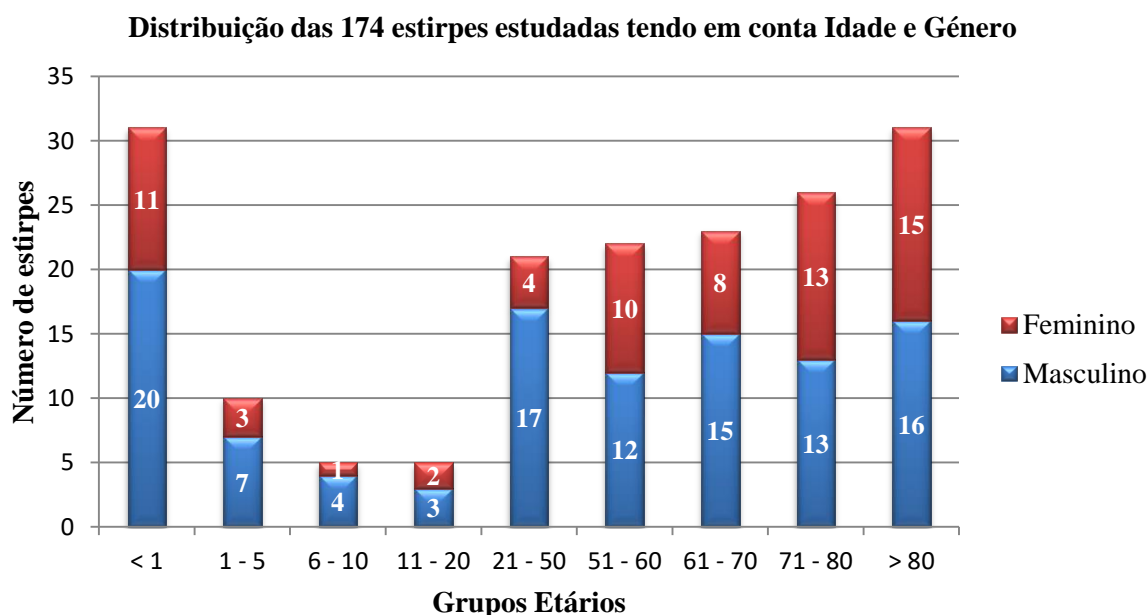


Figura 3.1.1. Distribuição das estirpes de *H. influenzae* pelos grupos etários definidos e pelo género do paciente.

A pesquisa e caracterização da cápsula foi efetuada para todas as 174 estirpes estudadas, tal como descrito nos Materiais e Métodos.

A Tabela 3.1.1. apresenta os resultados obtidos para a caracterização do estado capsular.

Tabela 3.1.1. Pesquisa e caracterização da cápsula: 2011 – 2016.

Ano	Hia (%)	Hib (%)	Hie (%)	Hif (%)	NC (%)	TOTAL
2011	-	4	-	-	18	22
2012	1	-	1	-	21	23
2013	1	5	-	1	22	29
2014	-	5	-	4	23	32
2015	-	1	1	-	29	31
2016	2	6	-	-	29	37
TOTAL	4 (2,3)	21 (12,1)	2 (1,1)	5 (2,9)	142 (81,6)	174

NC é referente às estirpes HiNC. Não foi detetada a presença de estirpes pertencentes aos serotipos c e d.

Das 174 estirpes, 142 eram HiNC (81,6%), e 32 eram capsuladas (18,4%).

Relativamente às estirpes capsuladas 12,1% foram caracterizadas como pertencendo ao serotipo b (21/174), 2,9% eram do serotipo f (5/174), 2,3% do serotipo a (4/174), e 1,1% eram do serotipo e (2/174). No conjunto de estirpes estudadas entre 2011 e 2016 não foi caracterizada nenhuma estirpe dos serotipos c e d.

Relativamente às estirpes do serotipo b (21/174), 57,1% eram provenientes de pacientes com idade inferior a 18 anos (12/21), e 42,9% das estirpes foram isoladas de pacientes adultos (9/21).

Nas crianças com doença invasiva a Hib, verificaram-se 3 casos de falência vacinal. Considerou-se falência vacinal nos casos em que ocorreu doença invasiva numa criança vacinada (após pelo menos 2 doses de vacina administrada), até 1 ano de idade (inclusive), tendo em conta o período de incubação e o tempo necessário para adquirir imunidade (Heath *et al*, 2000; Ladhani *et al*, 2010).

3.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Foi determinada a suscetibilidade aos antibióticos em 171 das 174 estirpes estudadas. Os 13 antibióticos estudados são os mais relevantes para o tratamento das infeções causadas por *Haemophilus influenzae* – amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, azitromicina, cefaclor, cefepime, cefotaxima, cefuroxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, meropenem, rifampicina, tetraciclina e trimetoprima/sulfametoxazol – tal como descrito em Materiais e Métodos.

Na Tabela 3.2.1 estão representados os valores referentes à suscetibilidade das estirpes estudadas (171/174). A tabela foi elaborada tendo em conta a concentração inibitória mínima (CIM), em mg/L, e os *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST (2017). As estirpes foram divididas em 3 categorias: Suscetível (S), Intermédio (I) e Resistente (R). Para alguns dos antibióticos, não foi ainda definido um *breakpoint*, a partir do qual a estirpe é considerada como sendo uma estirpe resistente.

Tabela 3.2.1. Suscetibilidade aos antibióticos das 171 estirpes estudadas, de acordo com as categorias e breakpoints estabelecidos pelo EUCAST: CIM₅₀, CIM₉₀ e percentagem (%) de estirpes suscetíveis (S), intermédias (I) e resistentes (R).

Antibiótico	CIM ₅₀ (mg/L)	CIM ₉₀ (mg/L)	Limites de variação da CIM (mg/L)	S (%)	I (%)	R (%)
Amc	0,5	1	≤ 0,25 - > 2	157 (92)	14 (8)	-
Amp	0,25	> 8	≤ 0,03 - > 8	147 (86)	-	24 (14)
Azi	0,5	1	≤ 0,25 - 4	-	171 (100)	-
Cfr	≤ 1	8	≤ 1 - ≥ 16	-	-	-
Cpe	≤ 0,12	0,25	≤ 0,12 - > 0,5	166 (97)	-	5 (3)
Cft	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03 - 0,12	171 (100)	-	-
Crn	0,5	2	≤ 0,25 - 8	-	146 (85)	25 (15)
Cp	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	171 (100)	-	-
C	≤ 1	≤ 1	≤ 1 - > 8	170 (99)	-	1 (1)
Mer	≤ 0,06	0,12	≤ 0,06 - 0,25	171 (100)	-	-
Rif	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	171 (100)	-	-
SXT	≤ 0,25	> 2	≤ 0,25 - > 2	136 (79,5)	1 (0,5)	34 (20)
Te	≤ 1	≤ 1	≤ 1	171 (100)	-	-

Amc - Amoxicilina/Ácido clavulânico; **Amp** - Ampicilina; **Azi** - Azitromicina; **Cfr** - Cefaclor; **Cpe** - Cefepime; **Cft** - Cefotaxima; **Crn** - Cefuroxima; **C** - Cloranfenicol; **Cp** - Ciprofloxacina; **Mer** - Meropenem; **Rif** - Rifampicina; **Te** - Tetraciclina; **SXT** - Trimetoprima/Sulfametoxazol

As percentagens de resistência e suscetibilidade variaram tendo em conta o antibiótico estudado, sendo que de modo geral, as estirpes eram suscetíveis à maioria dos antibióticos.

A maioria das estirpes (157/171; 92%) foi considerada suscetível à amoxicilina/ácido clavulânico. As restantes (8%) foram incluídas na categoria de suscetibilidade intermédia.

Oitenta e seis por cento das estirpes (147/171) foram suscetíveis à ampicilina e as restantes 14% foram consideradas resistentes.

A totalidade das estirpes (100%) foi categorizada com suscetibilidade intermédia, relativamente à azitromicina.

De acordo com os parâmetros estabelecidos pelo EUCAST, não existem *breakpoints* definidos para o cefaclor. No entanto, a CIM₅₀, que representa a CIM que inibe 50% dos isolados, foi ≤ 1 mg/L, e a CIM₉₀, que inibe 90% dos isolados foi 8 mg/L. De acordo com as normas CLSI (utilizadas anteriormente), estas estirpes seriam consideradas como suscetíveis ao cefaclor.

A maior parte das estirpes deste estudo (97%) foram suscetíveis ao cefepime (cefalosporina de 4ª geração).

Todas as estirpes (100%) foram suscetíveis à cefotaxima, uma cefalosporina de 3ª geração.

A maioria das estirpes estudadas (85%) apresentou suscetibilidade intermédia à cefuroxima e 15% apresentou resistência a este antibiótico. Nenhuma estirpe foi caracterizada como suscetível à cefuroxima.

Todas as estirpes estudadas foram suscetíveis à ciprofloxacina.

Apenas uma das estirpes estudadas (1%) apresentou resistência ao cloranfenicol e as restantes foram suscetíveis (99%).

A totalidade das estirpes (100%) apresentou suscetibilidade ao meropenem e à rifampicina.

Cento e trinta e seis estirpes (79,5%) apresentaram suscetibilidade ao trimetoprima/sulfametoxazol. Apenas 1 estirpe (0,5%) apresentou suscetibilidade intermédia, e as restantes 20% apresentaram resistência a este antibiótico.

Todas as estirpes apresentaram suscetibilidade à tetraciclina.

3.3 PRODUÇÃO DE β -LACTAMASE

A produção de β -lactamase foi determinada para a totalidade da amostra estudada (n=174), de acordo com o método descrito nos Materiais e Métodos.

Estirpes Produtoras de β -lactamase (n=174)

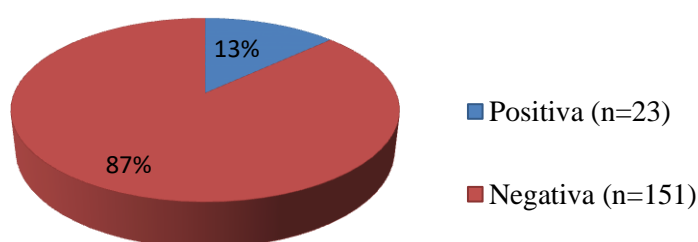


Figura 3.3.1. Percentagem de estirpes produtoras de β -lactamase. A vermelho encontra-se a percentagem de estirpes não produtoras de β -lactamase (β la-) e a azul encontra-se a percentagem das estirpes produtoras de β -lactamase (β la+).

A maioria das estirpes estudadas (151/174; 86,8%) é não produtora de β -lactamase, sendo as restantes 13,2% produtoras.

Relativamente às estirpes produtoras, verificou-se ainda que todas (100%) possuem uma resistência elevada à ampicilina (CIM \geq 8 mg/L).

Na amostra estudada, destacam-se 16 estirpes não produtoras de β -lactamase, que fenotipicamente poderão ser caracterizadas como BLNAR (16/151; 10,6%), uma vez que apresentaram valores de suscetibilidade reduzida à ampicilina (15 estirpes com CIM = 1 mg/L; 1 estirpes com CIM = 2 mg/L).

3.4 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

A genotipagem dos isolados de *H. influenzae* foi realizada pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), tal como descrito nos Materiais e Métodos.

A técnica de MLST foi realizada em 136 estirpes capsuladas e não capsuladas da amostra total (n=174).

Entre as 136 estirpes foram identificados 71 STs diferentes já conhecidos e incluídos na base de dados internacional. Foram ainda identificados 6 STs “novos” (não descritos na base de dados).

Na Figura 3.4.1 encontra-se uma das possíveis representações esquemáticas da diversidade genéticas das estirpes estudadas.

Os perfis de MLST revelaram elevada variabilidade genética (67%), com 71 STs diferentes, no subconjunto das estirpes HiNC (n=106).

As estirpes capsuladas (30 estirpes) apresentaram-se clonais, na medida em que cada serotipo foi associado a um determinado ST. Assim, 20 estirpes do serotipo b foram caracterizadas como ST6 (19/136; 14%) e ST190 (1/136; 0,7%), correspondendo todas as 20 estirpes ao CC6. Não foi realizado MLST para uma das estirpes do serotipo b. As estirpes do serotipo a foram caracterizadas como ST23 (4/136; 2,9%), as estirpes do serotipo e como ST18 (1/136; 0,7%), e as estirpes do serotipo f como ST124 (5/136; 3,7%).

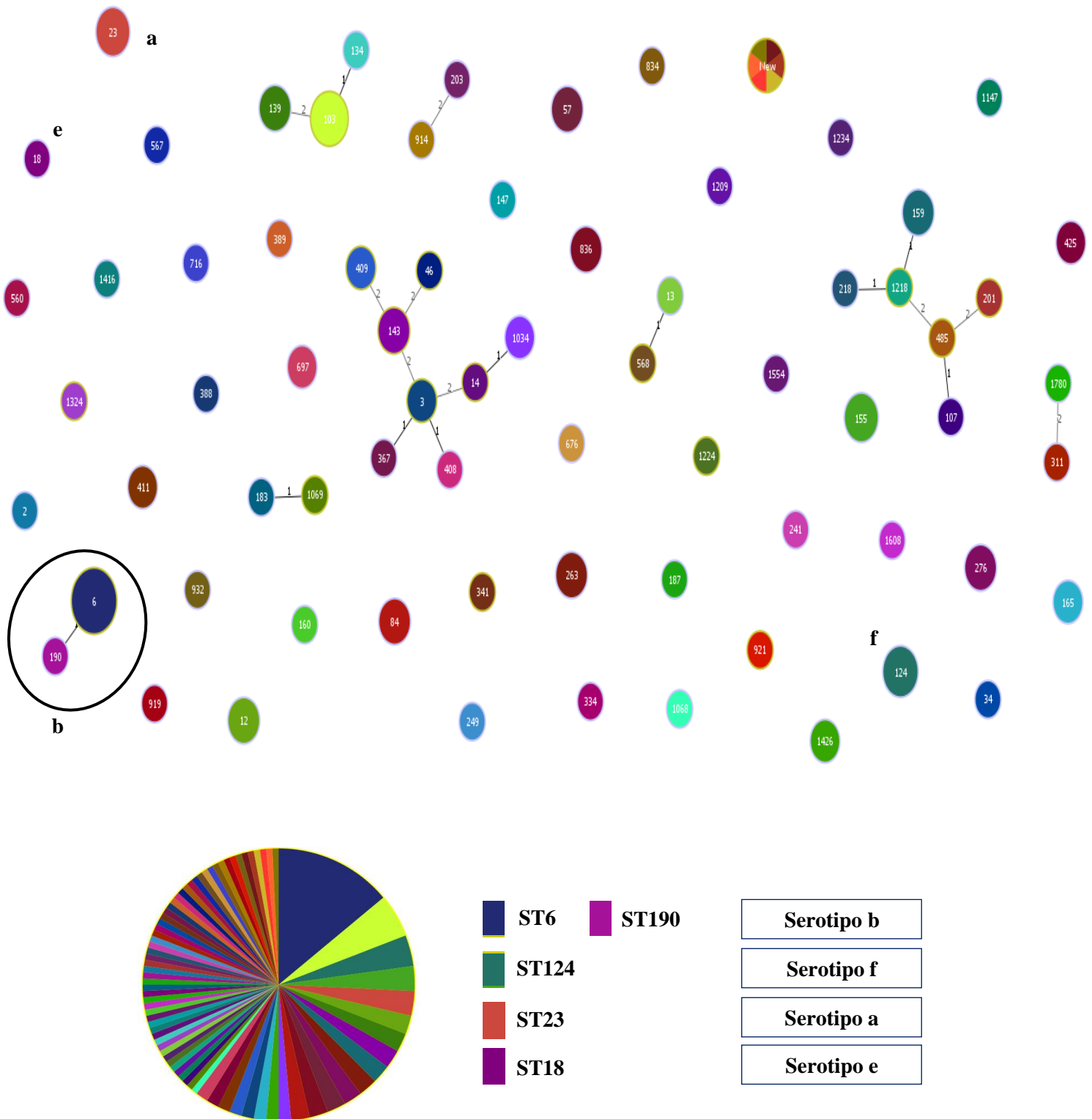


Figura 3.4.1 Representação esquemática da diversidade genética entre os isolados de *H. influenzae* (n=136), de acordo com o algoritmo goeBURST. Os ST estão indicados através de números no interior de círculos, em que o tamanho destes reflete o número de isolados para cada ST (não-linear). As linhas que ligam os vários círculos estão legendadas com o número que representa a distância alélica entre os STs. Consideraram-se apenas variações de um e dois *locus*. (PHYLOViZ 2.0©, disponível em www.phyloviz.net)

Na Tabela 3.4.1. estão representados os perfis alélicos dos isolados que não constam da base de dados internacional.

Todas as estirpes apresentaram perfis alélicos diferentes, com exceção das duas primeiras estirpes, que apenas diferiram em 3 loci – *fucK*, *mdh* e *pgi*.

Tabela 3.4.1. Perfis alélicos dos isolados de *H. influenzae* com ST não definido na base de dados internacional (“novos”).

Estirpe	Ano	<i>adk</i>	<i>atpG</i>	<i>frdB</i>	<i>fucK</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>recA</i>	ST
1	2013	3	18	53	2	17	165	23	Novo
2	2014	3	18	53	15	86	13	23	1829*
3	2014	1	117	1	14	9	14	13	Novo
4	2015	39	8	35	11	65	21	19	1830*
5	2015	26	14	1	1	7	57	50	Novo
6	2016	69	20	7	1	26	36	29	Novo

* ST foi atribuído após a entrega da versão provisória da dissertação. As restantes sequências serão submetidas para atribuição do ST.

3.5 DETECÇÃO DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA

Foi determinada a presença/ausência de 6 genes de virulência previamente selecionados - *pilA*, *ompP5*, *hmw1A/2A*, *hifA*, e *hia*, de acordo com o procedimento descrito nos Materiais e Métodos.

Para cada um dos genes estudados foi utilizado um sub-conjunto da amostra total (n=174).

Na Tabela 3.5.1., encontra-se a descrição do número de estirpes para as quais se detetou a presença/ausência dos genes estudados.

Tabela 3.5.1. Presença/Ausência de 6 genes determinantes de virulência.

Gene	Tamanho (pb)	Número de estirpes estudadas
<i>pilA</i>	416	74
<i>ompP5</i>	1040	74
<i>hmw1A</i>	140	46
<i>hmw2A</i>	199	46
<i>HifA</i>	810	46
<i>Hia</i>	3259	23

O tamanho do produto esperado após amplificação encontra-se definido na Tabela 3.5.1, para cada um dos genes referidos. Um esquema de cada um dos genes e respetivo produto de amplificação esperado poderá ser consultado nos Anexos (Anexos V-X).

Os resultados da amplificação dos genes foram categorizados como: Presente / Ausente.

Na Tabela 3.5.2., os resultados foram tratados de dois modos – tendo em conta todas as estirpes para os quais se amplificou o gene, e tendo apenas em conta as estirpes que eram HiNC – uma vez que os genes *hmw1A/2A*, *hifA* e *hia* não se encontram presentes em estirpes capsuladas.

Tabela 3.5.2. Presença/Ausência dos genes determinantes de virulência relativamente ao estado capsular.

Gene	Presença			
	HiNC (n/total)	%	HiNC + Capsuladas (n/total)	%
<i>pilA</i>	62/66	93,9	70/74	94,6
<i>ompP5</i>	59/66	89,4	66/74	89,2
<i>hmw1A</i>	24/40	60,0	24/46	52,2
<i>hmw2A</i>	24/40	60,0	24/46	52,2
<i>hifA</i>	6/40	15,0	6/46	13,0
<i>hia</i>	5/18	27,8	5/23	21,7

A tabela tem em conta a presença do gene exclusivamente nas estirpes HiNC, bem como no conjunto das estirpes HiNC e capsuladas, para comparação.

Foi detetada a presença do gene *pilA* em 62 das estirpes HiNC analisadas e em 70 das estirpes do conjunto HiNC e capsuladas (93,9% e 94,6%, respetivamente).

Relativamente ao gene *ompP5*, foi detetada a sua presença em 59 das estirpes HiNC (89,4%) e em 66 das estirpes do conjunto total analisado (89,2%).

Vinte e quatro das estirpes HiNC possuíam os genes *hmw1A/2A* (60%; 52,2% no conjunto total).

Apenas se detetou a presença do gene *hifA* em 6 estirpes (15% para o conjunto das estirpes HiNC; 13,0% no conjunto total das estirpes HiNC e capsuladas).

Apenas foi detetada a presença do gene *hia* em 5 das estirpes estudadas (27,8%; 21,7% no conjuntos total das estirpes HiNC e estirpes capsuladas).

Na Tabela 3.5.3., encontra-se a informação referente à presença ou ausência dos 6 genes, tendo ainda como referência os resultados referentes à produção de β -lactamase, pesquisa de cápsula, e MLST. Não existe informação acerca do ST de duas das estirpes. As estirpes encontram-se ainda ordenadas tendo em conta o ano de isolamento das estirpes (do mais antigo para o mais recente).

Na Tabela 3.5.4, encontra-se o mesmo tipo de informação (ordenado da mesma forma), mas tendo apenas em conta as estirpes para as quais existem resultados relativos à presença/ausência de pelo menos 3 dos genes estudados.

Tabela 3.5.3. Presença/Ausência (+/-) dos 6 genes de virulência estudados - *pilA*, *ompP5*, *hifA*, *hmw1A/2A* e *hia* relativamente à produção de β -lactamase, estado capsular e ST.

β -lactamase	Cápsula	ST	<i>pilA</i>	<i>ompP5</i>	<i>hifA</i>	<i>hmw1A</i>	<i>hmw2A</i>	<i>hia</i>
Negativo	NC	103	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	139	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	276	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	334	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	84	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	139	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	134	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	143	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	568	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	408	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	203	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	13	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	341	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	3	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	b	6	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	241	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC		+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	914	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	139	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	1224	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	57	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	46	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	147	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Positivo	NC	57	+	-	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1608	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Positivo	NC	388	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	3	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1324	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	New	+	+	-	-	-	n.d.
Negativo	NC	57	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	84	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	411	+	+	n.d.	+	+	n.d.
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	932	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	263	+	+	n.d.	-	-	n.d.
Negativo	NC	1209	+	+	+	-	-	-
Negativo	NC	263	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	183	+	+	-	+	+	n.d.

Negativo	NC	107	+	+	+	-	-	n.d.
Negativo	NC	12	+	-	-	+	+	n.d.
Positivo	NC	103	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	676	-	+	-	-	-	+
Negativo	b	6	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Positivo	NC	836	+	+	-	-	-	n.d.
Positivo	NC		+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	New	+	+	-	-	-	+
Negativo	NC	34	+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	159	+	+	+	-	-	n.d.
Negativo	NC	409	+	+	+	+	+	-
Negativo	NC	409	+	+	+	+	+	n.d.
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Positivo	NC	836	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1780	+	+	-	-	-	+
Negativo	NC	697	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	187	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	a	23	+	+	-	-	-	n.d.
Negativo	NC	411	+	+	-	+	+	-
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	560	+	+	-	-	-	-
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Negativo	a	23	+	+	-	-	-	n.d.
Negativo	NC	155	+	+	-	-	-	-
Negativo	NC	716	+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	276	+	+	-	-	-	-
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1068	+	+	-	-	-	-
Negativo	NC	1069	+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	1426	+	+	+	-	-	-
Negativo	NC	919	-	+	-	-	-	+
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Positivo	NC	160	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	425	-	+	-	-	-	+



 ST não determinado; n.d. – não disponível. Não foi estudada a presença/ausência do gene.

Tabela 3.5.4. Presença/Ausência (+/-) dos 6 genes de virulência estudados - *pilA*, *ompP5*, *hifA*, *hmw1A/2A* e *hia* nas estirpes para as quais foram detectados pelo menos 3 dos genes estudados.

β -lactamase	Cápsula	ST	<i>pilA</i>	<i>ompP5</i>	<i>hifA</i>	<i>hmw1A</i>	<i>hmw2A</i>	<i>hia</i>
Positivo	NC	57	+	-	-	+	+	-
Positivo	NC	388	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	3	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1324	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	New	+	+	-	-	-	n.d.
Negativo	NC	57	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	84	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	411	+	+	n.d.	+	+	n.d.
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	932	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	263	+	+	n.d.	-	-	n.d.
Negativo	NC	1209	+	+	+	-	-	-
Negativo	NC	263	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
Negativo	NC	183	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	107	+	+	+	-	-	n.d.
Negativo	NC	12	+	-	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	676	-	+	-	-	-	+
Positivo	NC	836	+	+	-	-	-	n.d.
Positivo	NC		+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	New	+	+	-	-	-	+
Negativo	NC	34	+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	159	+	+	+	-	-	n.d.
Negativo	NC	409	+	+	+	+	+	-
Negativo	NC	409	+	+	+	+	+	n.d.
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Positivo	NC	836	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1780	+	+	-	-	-	+
Negativo	NC	697	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	187	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	a	23	+	+	-	-	-	n.d.
Negativo	NC	411	+	+	-	+	+	-
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	560	+	+	-	-	-	-
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Negativo	a	23	+	+	-	-	-	n.d.
Negativo	NC	155	+	+	-	-	-	-
Negativo	NC	716	+	+	-	+	+	-

Negativo	NC	276	+	+	-	-	-	-
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Positivo	NC	103	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	1068	+	+	-	-	-	-
Negativo	NC	1069	+	+	-	+	+	-
Negativo	NC	1426	+	+	+	-	-	-
Negativo	NC	919	-	+	-	-	-	+
Negativo	b	6	+	+	-	-	-	-
Positivo	NC	160	+	+	-	+	+	n.d.
Negativo	NC	425	-	+	-	-	-	+

 ST não determinado; n.d. – não disponível. Não foi estudada a presença/ausência do gene.

Apesar da elevada variabilidade das estirpes (HiNC), as estirpes com o mesmo ST e com o mesmo resultado relativamente à produção de β -lactamase, apresentaram ainda, de modo geral, o mesmo tipo de resultado de presença/ausência dos genes de virulência (estirpes com ST 103 e ST 411, por exemplo).

Para as estirpes capsuladas, os resultados foram consistentes e não foi detetada a presença dos genes *hmw1A/2A*, *hifA* e *hia*, que são genes exclusivos das estirpes HiNC.

4. DISCUSSÃO

4.1 PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DA CÁPSULA

Um dos acontecimentos mais marcantes na epidemiologia do *H. influenzae* foi a introdução da vacina contra o serotipo b, e a sua incorporação no PNV sucessivamente em diversos países, em todo o mundo (Ladhani *et al*, 2010).

Após a sua introdução, iniciou-se uma diminuição acentuada na prevalência de doença invasiva provocada por estirpes Hib, sobretudo na Europa. Esta diminuição foi acompanhada de um aumento na frequência da doença invasiva causada por estirpes HiNC (Peltola *et al*, 2000; Ladhani *et al*, 2010). Em algumas situações, esta inversão é tão relevante que se coloca a hipótese de uma “substituição”, por outras estirpes da mesma espécie, uma vez que, como a vacina conjugada contra as estirpes do serotipo b tem como efeito a redução da bactéria na faringe do portador, em teoria, estirpes não capsuladas ou de outros serotipos, poderiam assim causar doença invasiva (Tsang, 2007; Ladhani *et al*, 2010). Esta emergência das estirpes HiNC tem sido cada vez mais relevante no estudo da doença invasiva, estando inclusive agora também associada a casos muito graves (Gkentzi *et al*, 2012), o que foi também verificado neste estudo, em que 2 dos casos reportados como óbito foram devido a doença invasiva causada por uma estirpe HiNC (ambos pacientes com mais de 65 anos).

Nesta dissertação, foi analisada a epidemiologia do *H. influenzae*, com o intuito de caracterizar a doença invasiva em Portugal, no período compreendido entre 2011 e 2016 (inclusive), dando ênfase à caracterização fenotípica e genotípica dos isolados. Numa fase final pretendemos associar a presença/ausência de alguns dos principais genes de virulência, principalmente no caso das estirpes HiNC, com a gravidade das infeções a que este tipo de estirpes está cada vez mais associado.

Atualmente, os casos de doença invasiva, e sobretudo os que são devidos a estirpes HiNC, são mais comuns em pacientes adultos e em idosos com idade superior a 65 anos. Em alguns destes casos, a invasão por parte da estirpe acontece devido ao sistema imunitário do paciente encontrar-se debilitado (devido à idade ou outras doenças) (Ulanova & Tsang, 2009; Agrawal & Murphy, 2011). Em recém-nascidos, os casos de doença invasiva por estirpes HiNC pode ser até 10 vezes mais frequente do que por estirpes do serotipo b, com maior frequência de casos durante a primeira semana de vida (Ladhani *et al*, 2010; Collins *et al*, 2015).

O nosso trabalho vem de encontro a estes estudos, tendo-se observado, na população estudada (n=174), uma maior frequência de casos de doença invasiva em pacientes adultos, entre os 20 anos e os 92 anos, e em recém-nascidos até aos 11 meses. Em particular, observaram-se 26 casos de doença em pacientes entre os 0 e os 11 meses (14,9%), 15 casos em pacientes com idade entre 1 ano e 5 anos (inclusive) (8,62%), 10 casos em pacientes com idade entre os 6 anos e os 19 anos (5,75%), 42 casos em pacientes com idade entre os 20 anos e os 59 anos (24,1%), 49 casos em pacientes com idade entre os 60 anos e os 79 anos (28,2%), e 32 casos em pacientes com idade igual ou superior a 80 anos (18,4%).

Estes resultados estão ainda de acordo com o observado anteriormente em Portugal (Bajanca-Lavado *et al*, 2014), no período compreendido entre 2002 e 2010, onde se caracterizaram 144 estirpes isoladas de infeção invasiva tendo 38 estirpes HiNC sido isoladas de crianças até aos 18 anos de idade. No nosso estudo, com 174 casos de infeção invasiva, foram isoladas 33 estirpes HiNC, para o mesmo intervalo de idade. Em adultos (maiores de 18 anos), no estudo anterior foram isoladas 72 estirpes HiNC, enquanto que neste estudo foram isoladas 109 estirpes HiNC.

A maior parte das nossas estirpes foi isolada de pacientes do género masculino (61,5%) e as restantes 67 estirpes de pacientes do género feminino (38,5%). Esta tendência foi também verificada em estudos realizados em outros países (Campos *et al*, 2004, Tsang *et al*, 2016).

Relativamente ao produto de onde foram isoladas as estirpes verificou-se que a maior parte foi isolada a partir do sangue (150/174; 86,21%) e apenas uma pequena parte do líquido cefalorraquidiano (15/174; 8,62%). No entanto, num trabalho realizado com estirpes invasivas isoladas antes da introdução da vacina Hib no nosso PNV, a percentagem de estirpes isoladas do líquido cefalorraquidiano era bastante mais elevada (52/119; 43,7%) (Bajanca *et al*, 2004). Recentemente tem-se verificado que a maior parte das estirpes responsáveis por infeção invasiva são isoladas no sangue (Bajanca-Lavado *et al*, 2014; Puig, 2015), tendência esta que está de acordo com o estudo aqui apresentado.

Não foi disponibilizada informação sobre o diagnóstico clínico para a maioria dos casos. De acordo com a informação disponibilizada, o diagnóstico clínico mais frequente foi Pneumonia, Meningite e Septicémia, o que também foi verificado em outros países da Europa (Puig, 2015; ECDC, 2015, visualizado em Junho de 2017).

Quanto à região de onde proveio cada um dos isolados, foram utilizados os critérios das NUTS II para a localização dos hospitais, num total de 7 regiões diferentes. Como esperado, a maioria dos isolados são provenientes da Área Metropolitana de Lisboa (92/174; 52,9%) e da região do Norte (48/174 27,6%). Entre Janeiro de 2011 e Dezembro de 2016 não se verificou nenhum período preferencial durante o qual se tenham recolhido mais isolados, o que também está de acordo com os outros estudos realizados no nosso país.

A maioria das estirpes (n=142) foram caracterizadas como HiNC (81,6%), e 32 eram capsuladas (18,4%). Quanto à caracterização da cápsula, 12,1% das estirpes estudadas pertencem ao serotipo b (21/174), 2,9% são do serotipo f (5/174), 2,3% do serotipo a (4/174), e 1,1% são do serotipo e (2/174). Relativamente às estirpes do serotipo b (21/174), 57,1% das estirpes isoladas eram provenientes de pacientes com idade inferior a 18 anos (12/21), e 42,9% das estirpes foram isoladas de pacientes adultos (9/21).

Em Portugal, tendo apenas como referência os trabalhos de Bajanca-Lavado e colaboradores (Bajanca *et al*, 2004; Bajanca-Lavado *et al*, 2014), mas que seguem a tendência dos demais países, a introdução da vacina levou a uma diminuição significativa das estirpes Hib. No primeiro estudo, com 119 estirpes isoladas no período pré-vacina entre 1989 e 2001, 60,5% das estirpes eram do serotipo b (72/119) e apenas 38,6% eram estirpes HiNC (46/119). Em 2001, foi ainda descrita pela primeira vez em Portugal, uma estirpe de serotipo f. No estudo seguinte, realizado entre 2002 e 2010 e relativo a 144 estirpes de infeção invasiva, 77,1% dos isolados eram HiNC (111/144), 13,2% das estirpes pertenciam ao serotipo b (19/144) e 9,7% a outros serotipos (14/144): 6,9% ao serotipo f, 2,1% ao serotipo a, e 0,7% ao serotipo d. Neste sentido, o estudo conducente a esta dissertação reflete a tendência verificada ao longo dos anos, com uma diminuição no número de estirpes do serotipo b, e aumento da doença invasiva causada por estirpes HiNC, bem como um aumento na infeção por estirpes capsuladas não-b. Os estudos de vigilância são, por isso de extrema importância, de modo a avaliar a emergência destas estirpes e as alterações à epidemiologia da infeção.

Outros estudos europeus, realizados em Espanha e Itália, têm também caracterizado estirpes dos serotipos a, e, e f (Campos *et al*, 2004; Cerquetti *et al*, 2004). Num estudo a nível Europeu, conduzido por Ladhani e colaboradores (Ladhani *et al*, 2010), verificou-se também um aumento de estirpes capsuladas não-b, sendo que as mais frequentes pertenciam aos serotipos e e f.

Num estudo posterior, realizado em Inglaterra e País de Gales entre 2001 e 2010 (Ladhani *et al*, 2012), foi reportado um aumento de 11% na prevalência das estirpes do serotipo f e de 7,4% na prevalência das estirpes do serotipo e. Num outro estudo realizado nestes países e dedicado a recém-

nascidos, Collins e colaboradores (Collins *et al*, 2015) reportaram uma frequência de 97% para as estirpes HiNC, e 2 estirpes de serotipo f, como causadoras de doença invasiva.

No Canadá, verificou-se emergência do serotipo a, após a implementação da vacina conjugada contra o Hib, bem como casos de doença invasiva causada por estirpes dos serotipos e e f (Ulanova & Tsang, 2009). Posteriormente, num estudo que abrangeu o período entre 2000 e 2012, o serotipo a foi também identificado como sendo o serotipo predominante (Tsang, 2016).

Um exemplo também interessante de referir, uma vez que foi um país que apenas implementou a vacina conjugada contra o Hib mais recentemente (2008), em comparação com outros países, é o caso do Japão. No período pré-vacina, Hasegawa e colaboradores (Hasegawa *et al*, 2004) reportaram uma elevada frequência de estirpes do serotipo b, bem como um elevado nível de resistência a antibióticos.

No conjunto de estirpes estudadas entre 2011 e 2016 não foi detetada a presença de estirpes pertencentes aos serotipos c e d. Em Portugal, foi reportado, em 2009, o primeiro caso de doença invasiva por serotipo d (Calado *et al*, 2011).

A proporção de estirpes caracterizadas pertencentes aos serotipos a e f é ainda preocupante, pois, à semelhança de Portugal, estes serotipos têm vindo a ser caracterizados com maior frequência na Europa. Para os anos de 2007-2014 foi reportado um aumento nos casos de doença invasiva causados por estirpes do serotipo f, evidenciado em idosos com mais de 60 anos (Tsang *et al*, 2017; Whittaker *et al*, 2017). Estas estirpes são oriundas do Canadá e do Brasil. Tsang e colaboradores reportou uma predominância dos serotipo a (23%, em 45,4% de estirpes capsuladas) e f (10,8%), no Canadá (Tsang *et al*, 2017). No Brasil, num estudo publicado recentemente e em que utilizaram estirpes isoladas entre 1986 (pré-vacina) e 2014, foi reportado um aumento significativo na frequência das estirpes do serotipo a, após a introdução da vacina, que ocorreu em 1999. O serotipo a terá sido responsável por 11 de 197 casos de meningite (entre 2000 e 2014) (Tuyama *et al*, 2014).

4.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Apesar de *H. influenzae* ser um organismo normalmente suscetível aos antibióticos, a sua epidemiologia tem vindo também a mudar ao longo do tempo. Estas mudanças devem-se não só à introdução de novos antibióticos e mecanismos de resistência enzimática (com produção de β -lactamase), como também à alteração das proteínas PBP, e ainda à introdução da vacina conjugada contra o Hib, como já mencionado anteriormente (Hasegawa *et al*, 2006; Garcia-Cobos, *et al*, 2007; Dabernat & Delmas, 2012).

É ainda de notar que alguns dos antibióticos incluídos no estudo caíram em desuso, devido ao seu potencial tóxico, como é o caso do cloranfenicol e tetraciclina. Assim, a resistência a estes antibióticos diminui drasticamente com a introdução da vacina Hib, pois as estirpes do serotipo b eram multirresistentes (ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina), sendo agora suscetíveis à maior parte dos antibióticos. A principal resistência observada (14%) é relativamente à ampicilina, sendo que apenas 8% das estirpes apresentavam suscetibilidade intermédia à associação amoxicilina/ácido clavulânico, antibióticos estes usados como primeira linha de tratamento, principalmente nas infeções respiratórias. Para os antibióticos utilizados como primeira escolha no tratamento de infeção invasiva, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, não se observou resistência, com exceção do cefepime (3%). No primeiro estudo português (Bajanca *et al*, 2004), observou-se o declínio das estirpes multirresistentes, de 50% entre 1989-1993, a 28,6% entre 1994-1999 e 0% em 2000. Esta diminuição foi provavelmente devida ao declínio do Hib, no mesmo período.

No estudo pós-vacina para o período 2002-2010, observou-se também uma diminuição pronunciada na resistência à tetraciclina (de 16% para 2,1%) e ao cloranfenicol (de 10% para 0%). Não se verificou a presença de estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração.

O trimetoprima/sulfametoxazol é o antibiótico onde se detetou a maior percentagem de resistência (20%), uma percentagem de resistência a ter em consideração, apesar de este não ser um antibiótico utilizado em doentes com infeção invasiva. Resultados semelhantes foram reportados na Europa e Estados Unidos/Canadá (Eliopoulos & Huovinen, 2001; Karpanoja *et al*, 2008; Sill & Tsang, 2008), cuja explicação poderá estar associada à elevada prescrição deste antibiótico, não para infeções associadas a *H. influenzae*, mas sim associadas a outros organismos, e que conduzem a um aumento do nível de resistência.

O panorama em Portugal é semelhante ao verificado no resto do mundo (com a exceção de países como o Japão). No período pré-vacina, a maioria dos casos de doença invasiva eram devido a estirpes do serotipo b, com uma elevada percentagem de estirpes multirresistentes. A introdução da vacina conjugada e consequente alteração da epidemiologia (diminuição na frequência de estirpes capsuladas do serotipo b, aumento na frequência de estirpes não capsuladas) modificou o fenótipo de resistência para o já descrito anteriormente.

4.3 PRODUÇÃO DE β -LACTAMASE

A maioria das estirpes deste estudo (86,8%) era não produtora de β -lactamase, sendo as restantes 13,2% produtoras. Todas as estirpes produtoras (100%) revelaram uma resistência elevada à ampicilina (CIM \geq 8).

A frequência de estirpes produtoras de β -lactamase na Europa é elevada em Espanha, França e Reino Unido (Fluit *et al*, 2005; Giufré *et al*, 2013).

Em Portugal, o número de isolados produtores de β -lactamase tem vindo a diminuir (26,9% entre 1989-2001; 10,4% entre 2002-2010) (Bajanca *et al*, 2004; Bajanca-Lavado *et al*, 2014).

Salientamos, no entanto, 16 estirpes (16/151; 10,6%), com características fenotípicas que as permitem caracterizar como BLNAR. Esta percentagem é semelhante à encontrada anteriormente, no estudo relativo à infeção invasiva no período pós-vacinal (Bajanca-Lavado *et al*, 2014) onde foram caracterizadas 11 estirpes BLNAR (11/129; 11,5%). Em Portugal, este mecanismo de resistência tem sido estudado principalmente em estirpes isoladas de infeção respiratória (Barbosa *et al*, 2011; Guilherme, 2013), onde se verificou uma emergência de estirpes com este fenótipo de resistência, não tendo estirpes desta natureza sido detetadas no período pré-vacina (1989-2001).

Outros estudos têm reportado emergência deste tipo de estirpes resistentes, como por exemplo em Espanha (García-Cobos *et al*, 2007) e Canadá (Tsang *et al*, 2009).

Esta ‘raridade’ na ocorrência das estirpes BLNAR durante o período pré-vacina foi também reportada noutros países como a Finlândia (próximo de 0%) e Estados Unidos (2,5%).

Espanha, Coreia do Sul e Japão são países para os quais se verificam algumas exceções, uma vez que os antibióticos normalmente prescritos em cada caso são também diferentes. Observou-se uma frequência entre 23% a 56% de estirpes BLNAR para estes países (García-Cobos *et al*, 2007; Tristram *et al*, 2007).

Mais recentemente, outros estudos no Japão reportaram uma frequência de 63,5% (Minami *et al*, 2016) e de 60,5% (Kakuta *et al*, 2016). Na Coreia do Sul, foi reportada uma frequência de 40,2% de estirpes BLNAR (Park *et al*, 2013).

Tendo em conta que o mecanismo por detrás das substituições de aminoácidos nestas estirpes são mutações pontuais, é necessário continuar a vigilância, para monitorizar as estirpes com este mecanismo de resistência (Dabernat & Delmas, 2012), tanto relativamente aos perfis de mutações, como à sua frequência.

4.4 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING

Desde a sua introdução que a eficácia do MLST é evidente, podendo esta técnica ser utilizada num largo espectro de bactérias, como uma forma simples de melhor entender a diversidade genotípica dos isolados. Na maioria das bactérias é utilizado um esquema de 7 genes, como é o caso do *H. influenzae*, em que se associa um número a cada isolado (ST). A análise desse resultado permite caracterizar complexos clonais e associá-los a determinantes de patogenicidade ou de resistência a antibióticos, entre outros (Jolley & Maiden, 2014).

Este estudo foi realizado em 136 estirpes (HiNC=106; capsuladas=30), e foram identificados 71 STs diferentes entre os HiNC (71/106; 67%) já conhecidos e incluídos na base de dados internacional, o que demonstra uma elevada variabilidade genética. Seis destes STs ainda não estão descritos e deverão ser submetidos à base de dados para atribuição de um novo número. Por outro lado as estirpes capsuladas apresentam-se clonais: as estirpes do serotipo b foram caracterizadas como ST6 (n=19; 14%) e ST190 (n=1; 0,7%) (CC6); as estirpes do serotipo a foram caracterizadas como ST23 (n=4; 2,9%), as estirpes do serotipo e como ST18 (n=1; 0,7%), e as estirpes do serotipo f como ST124 (n=5; 3,7%).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriormente observados em Portugal e em outros países (Bajanca *et al*, 2004; Erwin *et al*, 2008; LaCross *et al*, 2013; Bajanca-Lavado *et al*, 2014;), onde se verifica uma grande diversidade de estirpes HiNC e elevada clonalidade nas estirpes capsuladas.

Nas estirpes não capsuladas, a maioria dos STs foi encontrada apenas entre uma a três vezes. A clonalidade não é evidente e os complexos clonais são relativamente pequenos, o que também está de acordo com outros estudos (LaCross *et al*, 2013; Giufre *et al*, 2013).

Apesar de toda a diversidade entre as estirpes HiNC, o ST mais frequente foi o ST-103 (n=7), que corresponde a 5% do total de perfis analisados. Seis desses isolados provieram de indivíduos adultos e um de uma criança, não tendo entre eles qualquer associação epidemiológica aparente.

4.5 DETECÇÃO DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA

Foram estudados 6 fatores de virulência: *pilA* e *ompP5*, que podem estar presentes em qualquer estirpe, capsulada ou não capsulada, e *hmw1A/2A*, *hifA*, e *hia* que podem estar presentes em estirpes não capsuladas, sendo que *hifA* é ainda um fator de virulência presente nas estirpes do serotipo b.

A subunidade *pilA* encontra-se presente em quase todas as estirpes de *H. influenzae*. A sua presença na maioria das estirpes causadoras de doença invasiva era esperada, uma vez que a proteína *pilA* (altamente imunogénica) desempenha um papel na mobilidade e aderência da bactéria às células do hospedeiro, na primeira fase da invasão (Kolappan *et al*, 2012). A sua sequência é ainda

conservada nos isolados desta espécie, com exceção de um pequeno segmento na zona das cisteínas centrais e um outro fragmento próximo do C-terminal da proteína. Os *primers* utilizados (Vuong *et al*, 2013) para a amplificação deste gene foram assim uma boa escolha, uma vez que se ligam numa zona conservada (Novotny *et al*, 2011).

O gene *pilA* encontrou-se em 95% das estirpes estudadas (70/74), um resultado próximo do obtido no estudo de Vuong e colaboradores – 98% (49/50) (Vuong *et al*, 2013).

Curiosamente, para um dos isolados HiNC β la- foi obtida uma banda com um peso molecular acima do esperado, e que foi registado como negativo (gene ausente). Uma possibilidade, poderia ser que o produto amplificado se tratasse do *cluster comABCDEF*, homólogo do *cluster pilABCD*, já que de acordo com o estudo de Carruthers e colaboradores (Carruthers *et al*, 2012), a amplificação do *cluster comABCDEF* resulta num produto de aproximadamente 500 pb (enquanto que a amplificação do gene *pilA* resulta num produto com 416 pb).

O gene *ompP5* é outro gene de virulência importante que se encontra presente em quase todas as estirpes de *H. influenzae*. A proteína P5 é um fator importante para estas estirpes uma vez que atua na evasão ao sistema complemento, uma das linhas de defesa do hospedeiro (Rosadini *et al*, 2014).

No presente estudo, o gene estava presente em 89% dos isolados (66/74), uma percentagem superior ao valor obtido por Vuong e colaboradores (26/50; 52%) (Vuong *et al*, 2013). Os nossos resultados são mais semelhantes ao reportado noutros estudos (Hiltke *et al*, 2002; Avadhanula *et al*, 2006).

As infeções invasivas por *H. influenzae* são precedidas por colonização do trato respiratório que é facilitado pelas fímbrias. O *cluster* das fímbrias das estirpes do serotipo b contém as subunidades A-E (*hifABCDE*). A transcrição destes genes é determinada por mudanças reversíveis nas repetições TA, na zona do promotor entre o *hifA* e o *hifB* (bidirecional). Este *cluster* possui ainda várias outras repetições e *hairpins* (Geluk *et al*, 1998), o que o torna num gene particularmente difícil de estudar.

Neste trabalho apenas se detetou a presença do gene *hifA* em 6 estirpes (6/46; 13%). Cardines e colaboradores reportaram um valor de presença do gene de 22% (2/9), sendo um valor mais elevado, há a salientar o tamanho reduzido da amostra.

A colonização do epitélio pela bactéria requer adesinas. A maioria das estirpes HiNC expressa as adesinas HMW1A/2A, que apresentam 80% de homologia entre elas. Estas são o alvo principal da resposta imunitária, durante a infeção. A HMW1 e HMW2 são codificadas por loci diferentes, cada um consistindo em 3 genes – *hmwA*, *hmwB* e *hmwC* (Barenkamp *et al*, 1994; Buscher *et al*, 2004).

Estas adesinas são altamente imunogénicas e sofrem fenómenos de variação de fase, de modo a se adaptarem ao seu ambiente. Apesar do seu grau de homologia, sabe-se que a expressão destas 2 adesinas varia consoante um número de repetições *tandem* de 7 pb, nos promotores destes genes (Dawid *et al*, 1999; Giufré *et al*, 2008).

No nosso trabalho, 24 estirpes HiNC possuem os genes *hmw1A/2A* (60%; 52,2% no conjunto total estudado, no qual se incluem estirpes capsuladas). No entanto, de acordo com St Geme e colaboradores (St Geme *et al*, 1998), este gene encontra-se presente em aproximadamente 80% das estirpes HiNC. Em 2002, estes investigadores publicaram novo artigo, onde referiram que este gene se encontrava presente em 75% das estirpes não capsuladas. Vuong e colaboradores (Vuong *et al*, 2013), reportaram a presença destes genes em 66% das estirpes (33/50), um valor mais próximo do obtido.

A adesina do *H. influenzae* (*hia*) é homóloga da Hsf, encontrada em estirpes capsuladas. Para além disso, a *hia* é uma proteína mutuamente exclusiva com a HMW, isto é, os isolados que expressam esta adesina, não expressam a Hia (Rodriguez *et al*, 2003; Resman, 2012). O gene *hia* apresenta domínios conservados, no entanto, pode ter repetições de T de aproximadamente 110 bp, na região *upstream* e pode ainda ter deleções entre 2 a 49 aminoácidos (St Geme *et al*, 2000; Attack *et al*, 2015).

Apenas foi detectada a presença do gene *hia* em 5 das estirpes estudadas (27,8%; 21,7% no conjunto total das estirpes HiNC e estirpes capsuladas). Este valor não está muito longe do esperado, de acordo com um estudo de Barenkamp e colaboradores onde se verificou que a frequência deste gene era de 25% (Barenkamp *et al*, 1996). Por outro lado, Cardines e colaboradores (Cardines *et al*, 2007) reportaram a presença de *hia* em 5 estirpes (5/9; 55,5%) em crianças com meningite, o que poderá explicar a importância da adesina *hia* na virulência das estirpes responsáveis por meningite.

Pretende-se, num futuro próximo, complementar este estudo de presença/ausência de fatores de virulência com o estudo da expressão proteica, de modo a melhor se conhecer o grau de patogenicidade das estirpes invasivas que circulam no nosso país.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os nossos resultados mostraram que a doença invasiva a *H. influenzae* em Portugal se deve maioritariamente a estirpes HiNC (81,6%; 142/174). As estirpes capsuladas contabilizaram 18,4% dos isolados (32/174), e foram caracterizadas como: 2,3% do serotipo a (4/174), 12,1% do serotipo b (21/174), 1,1% do serotipo e (2/174) e 2,9% serotipo f (5/174).

Esta tendência é semelhante à reportada em Portugal, em anos anteriores – desde a era pré-vacina (1989-2001) até ao último estudo (2002-2010), as estirpes HiNC aumentaram de 19% para 77%, respetivamente. Relativamente às estirpes capsuladas observou-se neste estudo uma ligeira diminuição: 18,4% contra 22,9% no estudo realizado entre 2002 e 2010), provavelmente devida à diminuição no número de estirpes do serotipo f: 2,9% neste estudo contra 6,9% no estudo anterior.

Há que ter em conta as estirpes do serotipo b ainda em circulação no país (12,1%), sobretudo em crianças (57,1%). Estes números são semelhantes ao verificado anteriormente em Portugal, para o serotipo b (13,2%). Apesar de se ter verificado uma diminuição no número de estirpes Hib no período pós-vacina, é necessário vigiar a sua evolução ao longo do tempo (sobretudo em crianças), e ter ainda em conta que para alguns países da Europa, a diminuição no número destas estirpes é mais evidente.

Neste estudo foram também caracterizadas 2 estirpes do serotipo e, descritas pela primeira vez em Portugal.

A proporção de estirpes dos serotipos a e f é ainda potencialmente preocupante, e, à semelhança do que está a acontecer em Portugal, têm vindo a ser caracterizados com maior frequência em outros países Europeus.

O número de falências vacinais (de acordo com a definição) deverá também ser tido em consideração no futuro; uma vez que em 2017 ocorreram modificações no PNV, e a vacina é agora hexavalente (https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2016/06/programa_vacinacao_sns.pdf. Visualizado em Setembro de 2017), dever-se-á continuar a realizar uma vigilância atenta.

A maioria das estirpes caracterizadas era suscetível aos antibióticos estudados. Doze por cento das estirpes eram produtoras de β -lactamase. Este valor encontra-se de acordo com os valores obtidos em outros estudos Europeus.

Os perfis de MLST revelaram elevada variabilidade genética entre as estirpes HiNC, tal como esperado, com 71 STs diferentes entre os 106 isolados (67%). As estirpes capsuladas apresentaram-se clonais: o serotipo b foi atribuído aos ST6 e ST 190 (CC6), o serotipo a ao ST23, serotipo e ao ST18, e o serotipo f ao ST124.

Assim, a doença invasiva em Portugal é predominantemente devido a estirpes HiNC, de modo geral suscetíveis aos antibióticos, e geneticamente diversas.

Foram ainda estudados alguns dos fatores de virulência num subconjunto da amostra global. Estes factores, essenciais na fase de adesão ao hospedeiro, não se encontram obrigatoriamente em todas as estirpes e a sua presença não está associada a uma maior gravidade da infeção. No entanto, eventos como recombinação genética, ou variação de fase, estão entre os fatores que mais contribuem para o *fitness* do microrganismo, aquando da colonização da nasofaringe, contribuindo para uma maior patogenicidade, principalmente das estirpes HiNC.

Os eventos de variação de fase são importantes nestas estirpes, uma vez que as proteínas HMW1A/2A, hifA e hia são altamente imunogénicas (sendo que HMW e hia são adesinas de superfície). Este tipo de estudos de presença/ausência de genes, associados ao estudo da expressão proteica, e conjugados com a informação clínica do paciente, poderão ajudar numa melhor compreensão e caracterização da doença invasiva por HiNC.

Este estudo contribuiu para o esclarecimento da doença invasiva a *H. influenzae* em Portugal, na medida em que foram caracterizadas as estirpes isoladas entre 2011 e 2016, apresentando agora os

dados atualizados, desde a data do último estudo (2002-2010) até ao final do ano passado (2011-2016), adicionando ainda dados relativos à virulência das estirpes.

Devido à dinâmica deste patógeno, a vigilância é de extrema importância, para que possam ser desenvolvidas estratégias de prevenção adequadas.

REFERÊNCIAS

- Christensen, H., Kuhnert, P., Nørskov-Lauritsen, N., Planet, P.J., & Bisgaard, M. (2014). The Family *Pasteurellaceae*. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 535–564.
- Christensen, H., & Bisgaard, M. (2008). Taxonomy and biodiversity of members of *Pasteurellaceae*. *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*, 1-26.
- Naushad, S., Adeolu, M., Goel, N., Khadka, B., Al-Dahwi, A., & Gupta, R. S. (2015). Phylogenomic and molecular demarcation of the core members of the polyphyletic *Pasteurellaceae* genera *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*. *International journal of genomics*.
- Di Bonaventura, M.P., Lee, E. K., DeSalle, R., & Planet, P.J. (2010). A whole-genome phylogeny of the family *Pasteurellaceae*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(3), 950-956.
- Reidl, J., Schlör, S., Kraiß, A., Schmidt-Brauns, J., Kemmer, G., & Soleva, E. (2000). NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Molecular microbiology*, 35(6), 1573-1581.
- Tristram, S., Jacobs, M.R., & Appelbaum, P.C. (2007). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), 368-389.
- King, P.T., & Sharma, R. (2015). The lung immune response to nontypeable *Haemophilus influenzae* (lung immunity to NTHi). *Journal of immunology research*.
- Erwin, A.L., & Smith, A.L. (2007). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends in microbiology*, 15(8), 355-362.
- Rahman, N.A. (2009). Comparison of virulence determinants of different strains of *Haemophilus influenzae*. *Heratonline. com*.
- Ulanova, M., & Tsang, R.S. (2014). *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections. *The Lancet infectious diseases*, 14(1), 70-82.
- Todar, K. (2008). Online Textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin.
- Sá-Leão, R., Nunes, S., Brito-Avô, A., Alves, C. R., Carriço, J. A., Saldanha, J., de Lencastre, H., *et al* (2008). High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. *Journal of clinical microbiology*, 46(1), 225-234.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., McKenney, K., *et al*. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *science*, 496-512.

- Jalalvand, F., & Riesbeck, K. (2014). *Haemophilus influenzae*: recent advances in the understanding of molecular pathogenesis and polymicrobial infections. *Current opinion in infectious diseases*, 27(3), 268-274.
- Cardines, R., Daprai, L., Giufrè, M., Torresani, E., Garlaschi, M.L., & Cerquetti, M. (2015). Genital carriage of the genus *Haemophilus* in pregnancy: species distribution and antibiotic susceptibility. *Journal of medical microbiology*, 64(7), 724-730.
- Falla, T.J., Crook, D.W., Brophy, L.N., Maskell, D., Kroll, J.S., & Moxon, E.R. (1994). PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10), 2382-2386.
- Murphy, T.F., Faden, H., Bakaletz, L.O., Kyd, J.M., Forsgren, A., Campos, J., Pelton, S.I., *et al.* (2009). Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. *The Pediatric infectious disease journal*, 28(1), 43-48.
- Pittman, M. (1931). Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *Journal of experimental medicine*, 53(4), 471-492.
- Satola, S.W., Schirmer, P.L., & Farley, M.M. (2003). Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infection and immunity*, 71(6), 3639-3644.
- Van Eldere, J., Slack, M.P., Ladhani, S., & Cripps, A.W. (2014). Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *The Lancet infectious diseases*, 14(12), 1281-1292.
- Kroll, J.S., & Moxon, E.R. (1988). Capsulation and gene copy number at the cap locus of *Haemophilus influenzae* type b. *Journal of bacteriology*, 170(2), 859-864.
- Kroll, J.S., Loynds, B., Brophy, L.N., & Moxon, E.R. (1990). The bex locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Molecular microbiology*, 4(11), 1853-1862.
- Meng, G., Surana, N.K., St Geme, J.W., & Waksman, G. (2006). Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *The EMBO journal*, 25(11), 2297-2304.
- Davis, G.S., Sandstedt, S.A., Patel, M., Marrs, C.F., & Gilsdorf, J.R. (2011). Use of bexB to detect the capsule locus in *Haemophilus influenzae*. *Journal of clinical microbiology*, 49(7), 2594-2601.
- Schouls, L., Van der Heide, H., Witteveen, S., Zomer, B., Van der Ende, A., Burger, M., & Schot, C. (2008). Two variants among *Haemophilus influenzae* serotype b strains with distinct bcs4, hcsA and hcsB genes display differences in expression of the polysaccharide capsule. *BMC microbiology*, 8(1), 35.
- Waksman, G., Caparon, M., & Hultgren, S. (2005). Structural biology of bacterial pathogenesis. *ASM Press*. Washington, D.C.

Winn, W.S.A., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenbeger, P., & Woods, G. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Kapogiannis, B.G., Satola, S., Keyserling, H.L., & Farley, M.M. (2005). Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an IS 1016-bexA partial deletion: possible association with virulence. *Clinical Infectious Diseases*, 41(11), e97-e103.

Lima, J.B., Ribeiro, G. S., Cordeiro, S.M., Gouveia, E.L., Salgado, K., Spratt, B.G., Reis, J.N., *et al.* (2010). Poor clinical outcome for meningitis caused by *Haemophilus influenzae* serotype a strains containing the IS 1016-bexA deletion. *The Journal of infectious diseases*, 202(10), 1577-1584.

Giufre, M., Cardines, R., Brigante, G., Orecchioni, F., & Cerquetti, M. (2017). Emergence of invasive *Haemophilus influenzae* type a disease in Italy. *Clinical Infectious Diseases*, 64(11), 1626-1628.

Cerquetti, M., degli Atti, M. L. C., Renna, G., Tozzi, A. E., Garlaschi, M. L., & Mastrantonio, P. (2000). Characterization of non-type b *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. *Journal of clinical microbiology*, 38(12), 4649-4652.

Nelson, K.L., & Smith, A. L. (2010). Determination of capsulation status in *Haemophilus influenzae* by multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 66(3), 235-240.

Van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H., & Tibayrenc, M. (2001). Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 547-560.

Tang, Y.W., Stratton, C.W., & Tang, Y.W. (2013). Advanced techniques in diagnostic microbiology. Springer.

Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., *et al.* (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140–3145.

Maiden, M.C.J. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561–588.

Urwin, R., & Maiden, M.C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in microbiology*, 11(10), 479-487.

Maynard-Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M. & Spratt, B.G. (1993). How clonal are bacteria? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 4384–4388.

Chan, M.S., Maiden, M.C., Spratt, B.G. (2001). Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*, 17:1077-1083.

Jolley, K.A., Chan, M.S., & Maiden, M.C. (2004). mlstdbNet–distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC bioinformatics*, 5(1), 86.

- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Feavers, I.M., *et al.* (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
- Meats, E., Feil, E.J., Stringer, S., Cody, A.J., Goldstein, R., Kroll, J.S., Spratt, B.G., *et al.* (2003). Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1623-1636.
- Jolley, K.A., & Maiden, M.C. (2014). Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future microbiology*, 9(5), 623-630.
- Ibarz Pavón, A.B., & Maiden, M.C. (2009). Multilocus sequence typing. *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*, 129-140.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., & Spratt, B.G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of bacteriology*, 186(5), 1518-1530.
- Francisco, A.P., Vaz, C., Monteiro, P.T., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., & Carriço, J.A. (2012). PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC bioinformatics*, 13(1), 87.
- Resman, F. (2012). Invasive disease by *Haemophilus influenzae* in Sweden in the era of the *H. influenzae* type b vaccine (Vol. 2012, No. 70). Department of Laboratory Medicine, Lund University.
- Bae, S., Lee, J., Lee, J., Kim, E., Lee, S., Yu, J., & Kang, Y. (2010). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 65-71.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., & Strynadka, N.C. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology*, 8(5), 525-533.
- Fluit, A.C., Visser, M.R., & Schmitz, F.J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 836-871.
- Rubin, L.G., Medeiros, A.A., R.H. Yolken, & Moxon, E.R. (1981). Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. *Lancet* ii:1008–1010.
- Karlowsky, J.A., Verma, G.G., Zhanel, G., & Hoban, D.J. (2000). Presence of ROB-1 beta-lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:871–875.
- Ubukata, K., Shibasaki, Y., Yamamoto, K., Chiba, N., Hasegawa, K., Takeuchi, Y., Sunakawa, K., Inoue, K., & Konno, M. (2001). Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*.

Antimicrob. Agents Chemother. 45:1693–1699.

Barbosa, A.R., Giufrè, M., Cerquetti, M., & Bajanca-Lavado, M.P. (2011). Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(4), 788-796.

Matic, V., Bozdogan, B., Jacobs, M.R., Ubukata, K., & Appelbaum, P.C. (2003). Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), 1018-1021.

Ulanova, M. (2013). Global epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type a disease: do we need a new vaccine?. *Journal of Vaccines*.

Nizet, V., Colina, K.F., Almquist, J.R., Rubens, C.E., & Smith, A.L. (1996). A virulent nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *The Journal of infectious diseases*, 173(1), 180-186.

Gomez-De-Leon, P., Santos, J.I., Caballero, J., Gomez, D., Espinosa, L.E., Moreno, I., Cravioto, A., *et al.* (2000). Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2504-2511.

Bajanca, P., Caniça, M., & Multicenter Study Group. (2004). Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *Journal of clinical microbiology*, 42(2), 807-810.

Ulanova, M., & Tsang, R.S. (2009). Invasive *Haemophilus influenzae* disease: changing epidemiology and host–parasite interactions in the 21st century. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 594-605.

Bajanca-Lavado, M. P., Simões, A.S., Betencourt, C.R., & Sá-Leão, R. (2014). Infecção invasiva a *Haemophilus influenzae* entre 2002 e 2010: caracterização molecular e padrão de suscetibilidade aos antibióticos. *Boletim Epidemiológico Observações*, 3, 15-19.

de Carvalho, C.X., Kipnis, A., Thörn, L., de Andrade, J.G., Pimenta, F., de Cunto Brandileone, M.C., Andrade, A.L., *et al.* (2011). Carriage of *Haemophilus influenzae* among Brazilian children attending day care centers in the era of widespread Hib vaccination. *Vaccine*, 29(7), 1438-1442.

Ladhani, S.N., Collins, S., Vickers, A., Litt, D. J., Crawford, C., Ramsay, M.E., & Slack, M.P. (2012). Invasive *Haemophilus influenzae* serotype e and f disease, England and Wales. *Emerging infectious diseases*, 18(5), 725.

Langereis, J.D., & de Jonge, M.I. (2015). Invasive disease caused by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1711.

Read, R.C., Wilson, R., Rutman, A., Lund, V., Todd, H.C., Brain, A.P., Cole, P.J., *et al.* (1991). Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 163(3), 549-558.

- Rao, V.K., Krasan, G.P., Hendrixson, D.R., Dawid, S., & St. Geme III, J.W. (1999). Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 99-129.
- Duell, B.L., Su, Y.C., & Riesbeck, K. (2016). Host–pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS letters*, 590(21), 3840-3853.
- Atack, J.M., Srikhanta, Y.N., Fox, K.L., Jurcisek, J.A., Brockman, K.L., Clark, T.A., Grimmond, S. M., *et al.* (2015). A biphasic epigenetic switch controls immunoevasion, virulence and niche adaptation in non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Nature communications*, 6.
- Baddal, B., Muzzi, A., Censini, S., Calogero, R.A., Torricelli, G., Guidotti, S., Soriani, M., *et al.* (2015). Dual RNA-seq of nontypeable *Haemophilus influenzae* and host cell transcriptomes reveals novel insights into host-pathogen cross talk. *MBio*, 6(6), e01765-15.
- Noel, G.J., Love, D.C., & Mosser, D.M. (1994). High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans. *Infection and immunity*, 62(9), 4028-4033.
- Spiro RG (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12, 43r–56r.
- Fink, D.L, Buscher, A.Z., Green, B., Fernsten, P., & St Geme, J.W. 3rd. (2003) The *Haemophilus influenza* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* 5, 175–186.
- Hallstrom, T., Singh, B., Resman, F., Blom, A.M., Morgelin, M. & Riesbeck, K. (2011) *Haemophilus influenzae* protein E binds to the extracellular matrix by concurrently interacting with laminin and vitronectin. *J Infect Dis* 204, 1065–1074.
- Reddy, M.S., Bernstein, J.M., Murphy, T.F., & Faden, H.S. (1996). Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infection and immunity*, 64(4), 1477-1479.
- Puig Pitarch, C. (2015). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: colonization, infection and biofilm formation.
- Kubiet, M., Ramphal, R., Weber, A., & Smith, A. (2000). Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infection and immunity*, 68(6), 3362-3367.
- Novotny, L.A., & Bakaletz, L.O. (2016). Intercellular adhesion molecule 1 serves as a primary cognate receptor for the Type IV pilus of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Cellular microbiology*, 18(8), 1043-1055.

- Ruan, M.R., Akkoyunlu, M.U.S.T.A.F.A., Grubb, A., & Forsgren, A. (1990). Protein D of *Haemophilus influenzae*. A novel bacterial surface protein with affinity for human IgD. *The Journal of Immunology*, 145(10), 3379-3384.
- Harvey, H.A., Swords, W.E., & Apicella, M.A. (2001). The Mimicry of Human Glycolipids and Glycosphingolipids by the Lipooligosaccharides of Pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *Journal of autoimmunity*, 16(3), 257-262.
- Morey, P., Viadas, C., Euba, B., Hood, D.W., Barberan, M., Gil, C., Grillo, M.J., Bengoechea, J.A. & Garmendia, J. (2013) Relative contributions of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypeable *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Infect Immun* 81, 4100–4111.
- Harrison, A., Santana, E.A., Szelestey, B.R., Newsom, D.E., White, P. & Mason, K.M. (2013) Ferric uptake regulator and its role in the pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 81, 1221–1233.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M.J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology*, 13(10), 605.
- Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R.L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews. Immunology*, 15(6), 375.
- Langereis, J.D., Jonge, M.I., & Weiser, J.N. (2014). Binding of human factor H to outer membrane protein P5 of non-typeable *Haemophilus influenzae* contributes to complement resistance. *Molecular microbiology*, 94(1), 89-106.
- Rosadini, C.V., Ram, S., & Akerley, B.J. (2014). Outer membrane protein P5 is required for resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* to both the classical and alternative complement pathways. *Infection and immunity*, 82(2), 640-649.
- Michel, L.V., Snyder, J., Schmidt, R., Milillo, J., Grimaldi, K., Kalmeta, B., Pichichero, M.E., *et al.* (2013). Dual orientation of the outer membrane lipoprotein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of bacteriology*, 195(14), 3252-3259.
- Choi, J., Cox, A.D., Li, J., McCready, W., & Ulanova, M. (2014). Activation of innate immune responses by *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(5), 769-776.
- Ketterer, M.R., Shao, J.Q., Hornick, D.B., Buscher, B., Bandi, V.K., & Apicella, M.A. (1999). Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infection and immunity*, 67(8), 4161-4170.
- Clementi, C.F., & Murphy, T.F. (2011). Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 1.
- Patrick, D., Betts, J., Frey, E.A., Prameya, R., Dorovini-Zis, K., & Finlay, B.B. (1992). *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. *Journal of Infectious Diseases*, 165(5), 865-872.

- Tunkel, A.R., Wispelwey, B., Quagliarello, V.J., Rosser, S.W., Lesse, A.J., Hansen, E.J., & Scheld, W.M. (1992). Pathophysiology of blood-brain barrier alterations during experimental *Haemophilus influenzae* meningitis.
- Garmendia, J., Martí-Llitas, P., Moleres, J., Puig, C., & Bengoechea, J.A. (2012). Genotypic and phenotypic diversity of the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *Int Microbiol*, 15(4), 159-172.
- Mell, J.C., Shumilina, S., Hall, I.M., & Redfield, R.J. (2011). Transformation of natural genetic variation into *Haemophilus influenzae* genomes. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002151.
- Moxon, R., Bayliss, C., & Hood, D. (2006). Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 307-333.
- Power, P.M., Sweetman, W.A., Gallacher, N.J., Woodhall, M.R., Kumar, G.A., Moxon, E.R., & Hood, D.W. (2009). Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(2), 216-228.
- Vuong, J., Wang, X., Theodore, J.M., Whitmon, J., de Leon, P.G., Mayer, L.W., Romero-Steiner, S., et al. (2013). Absence of high molecular weight proteins 1 and/or 2 is associated with decreased adherence among non-typeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Journal of medical microbiology*, 62(11), 1649-1656.
- Duim, B., Bowler, L.D., Eijk, P.P., Jansen, H.M., Dankert, J., & van Alphen, L.O.E.K. (1997). Molecular variation in the major outer membrane protein P5 gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* during chronic infections. *Infection and immunity*, 65(4), 1351-1356.
- Bakaletz, L.O., Baker, B.D., Jurcisek, J.A., Harrison, A., Novotny, L.A., Bookwalter, J.E., Munson, R.S., et al. (2005). Demonstration of type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, 73(3), 1635-1643.
- Jurcisek, J.A., Bookwalter, J.E., Baker, B.D., Fernandez, S., Novotny, L.A., Munson, R.S., & Bakaletz, L.O. (2007). The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. *Molecular microbiology*, 65(5), 1288-1299.
- Carruthers, M.D., Tracy, E.N., Dickson, A.C., Ganser, K.B., Munson, R.S., & Bakaletz, L.O. (2012). Biological roles of nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus proteins encoded by the pil and com operons. *Journal of bacteriology*, 194(8), 1927-1933.
- Kolappan, S., Tracy, E.N., Bakaletz, L.O., Munson, R.S., & Craig, L. (2012). Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of PilA from the nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(3), 284-287.
- Barenkamp, S.J., & Leininger, E.L.I.Z.A.B.E.T.H. (1992). Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-

exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity*, 60(4), 1302-1313.

St Geme, J.W. (1994). The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. *Infection and immunity*, 62(9), 3881-3889.

Geme, J.W.S., & Yeo, H.J. (2009). A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. *Trends in microbiology*, 17(8), 355-360.

Giufre, M., Carattoli, A., Cardines, R., Mastrantonio, P., & Cerquetti, M. (2008). Variation in expression of HMW1 and HMW2 adhesins in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *BMC microbiology*, 8(1), 83.

Gilsdorf, J.R., McCrea, K.W., & Marrs, C.F. (1997). Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infection and immunity*, 65(8), 2997.

Geluk, F., Eijk, P.P., van Ham, S.M., Jansen, H.M., & van Alphen, L. (1998). The Fimbria Gene Cluster of Nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, 66(2), 406-417.

Gilsdorf, J.R., Marrs, C.F., & Foxman, B. (2004). *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infection and immunity*, 72(5), 2457-2461.

Erwin, A.L., Nelson, K.L., Mhlanga-Mutangadura, T., Bonthuis, P.J., Geelhood, J.L., Morlin, G., Henderson, F.W., *et al.* (2005). Characterization of genetic and phenotypic diversity of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, 73(9), 5853-5863.

Cardines, R., Giufre, M., Mastrantonio, P., degli Atti, M.L.C., & Cerquetti, M. (2007). Nontypeable *Haemophilus influenzae* meningitis in children: phenotypic and genotypic characterization of isolates. *The Pediatric infectious disease journal*, 26(7), 577-582.

Winter, L.E., & Barenkamp, S.J. (2014). Antibodies to the HMW1/HMW2 and Hia adhesins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate broad-based opsonophagocytic killing of homologous and heterologous strains. *Clinical and vaccine immunology*, 21(5), 613-621.

O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M., & Shingler, A.H. (1972). Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1(4), 283-288.

Heath, P.T., Booy, R., Azzopardi, H.J., Slack, M.P., Bowen-Morris, J., Griffiths, H., Moxon, E.R., *et al.* (2000). Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugate vaccination in the United Kingdom. *Jama*, 284(18), 2334-2340.

Peltola, H. (2000). Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clinical microbiology reviews*, 13(2), 302-317.

- Gkentzi, D., Slack, M.P., & Ladhani, S.N. (2012). The burden of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* in children and potential for prevention. *Current opinion in infectious diseases*, 25(3), 266-272.
- Agrawal, A., & Murphy, T.F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *Journal of clinical microbiology*, 49(11), 3728-3732.
- Collins, S., Litt, D. J., Flynn, S., Ramsay, M.E., Slack, M.P., & Ladhani, S.N. (2015). Neonatal invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales: epidemiology, clinical characteristics, and outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 60(12), 1786-1792.
- Campos, J., Hernando, M., Román, F., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Oteo, J., de Abajo, F., *et al.* (2004). Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against H. influenzae type b. *Journal of clinical microbiology*, 42(2), 524-529.
- Tsang, R.S., Li, Y.A., Mullen, A., Baikie, M., Whyte, K., Shuel, M., Spika, J., *et al.* (2016). Laboratory characterization of invasive *Haemophilus influenzae* isolates from Nunavut, Canada, 2000–2012. *International journal of circumpolar health*, 75(1), 29798.
- Cerquetti, M., Ciofi degli Atti, M.L., Cardines, R., Giufre, M., Romano, A., & Mastrantonio, P. (2004). *Haemophilus influenzae* serotype e meningitis in an infant. *Clinical infectious diseases*, 38(7), 1041-1041.
- Hasegawa, K., Kobayashi, R., Takada, E., Ono, A., Chiba, N., Morozumi, M., Ubukata, K., *et al.* (2006). High prevalence of type b β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1077-1082.
- García-Cobos, S., Campos, J., Lázaro, E., Román, F., Cercenado, E., García-Rey, C., de Abajo, F., *et al.* (2007). Ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2564-2573.
- Dabernat, H., & Delmas, C. (2012). Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001–2008: a retrospective database analysis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(10), 2745-2753.
- Eliopoulos, G.M., & Huovinen, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical infectious diseases*, 32(11), 1608-1614.
- Kärpänoja, P., Nyberg, S.T., Bergman, M., Voipio, T., Paakkari, P., Huovinen, P., Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, *et al.* (2008). Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7), 2480-2485.
- Sill, M.L., & Tsang, R.S. (2008). Antibiotic susceptibility of invasive *Haemophilus influenzae* strains in Canada. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1551-1552.

Fluit, A.C., Florijn, A., Verhoef, J., & Milatovic, D. (2005). Susceptibility of European β -lactamase-positive and-negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 133-138.

Giufre M, Cardines R, Accogli M, Pardini M, Cerquetti M. (2013). Identification of *Haemophilus influenzae* clones associated with invasive disease a decade after introduction of *H. influenzae* serotype b vaccination in Italy. *Clin Vaccine Immunol* 20:1223–1229. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00028-13>.

Guilherme, E.C.B. (2013). Caracterização dos mecanismos de resistência à ampicilina em estirpes clínicas de *Haemophilus influenzae* isoladas em Portugal entre o período de 2009 a 2012.

Minami, M., Sakakibara, R., Imura, T., Watanabe, M., Morita, H., Kanemaki, N., & Ohta, M. (2016). Clinical Characteristics of *Haemophilus influenzae* at General Hospital in the Central Region of Japan. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4(06), 18.ISO 690

Kakuta, R., Yano, H., Hidaka, H., Kanamori, H., Endo, S., Ichimura, S., Tanouchi, A., *et al.* (2016). Molecular epidemiology of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing acute otitis media in Japanese infants and young children. *The Pediatric infectious disease journal*, 35(5), 501-506.

Park, C., Kim, K.H., Shin, N.Y., Byun, J.H., Kwon, E.Y., Lee, J.W., Kang, J.H., *et al.* (2013). Genetic diversity of the *ftsI* gene in β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and β -lactamase-producing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. *Microbial Drug Resistance*, 19(3), 224-230.

Erwin, A.L., Sandstedt, S.A., Bonthuis, P.J., Geelhood, J.L., Nelson, K.L., Unrath, W.C., Sacchi, C.T., *et al.* (2008). Analysis of genetic relatedness of *Haemophilus influenzae* isolates by multilocus sequence typing. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1473-1483.

LaCross, N.C., Marrs, C.F., & Gilsdorf, J.R. (2013). Population structure in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 125-136.

Hiltke, T.J., Sethi, S., & Murphy, T.F. (2002). Sequence stability of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the human respiratory tract. *The Journal of infectious diseases*, 185(5), 627-631.

Avadhanula, V., Rodriguez, C.A., Ulett, G.C., Bakaletz, L.O., & Adderson, E.E. (2006). Nontypeable *Haemophilus influenzae* adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression. *Infection and immunity*, 74(2), 830-838.

Buscher, A.Z., Burmeister, K., Barenkamp, S.J., & Geme, J.W.S. (2004). Evolutionary and functional relationships among the nontypeable *Haemophilus influenzae* HMW family of adhesins. *Journal of bacteriology*, 186(13), 4209-4217.

Rodriguez, C.A., Avadhanula, V., Buscher, A., Smith, A.L., St Geme, J.W., 3rd, Adderson, E.E. (2003). Prevalence and distribution of adhesins in invasive non-type b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 71(4):1635-1642.

Barenkamp, S.J., & Geme, J.W.S. (1996). Identification of a second family of high molecular weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Molecular microbiology*, 19(6), 1215-1223.

ANEXOS

ANEXO I

Anexo I. *Primers* utilizados para a detecção e amplificação da região específica da cápsula (Falla *et al.* 1994).

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica	PCR em que são utilizados	Tamanho esperado (pb)
<i>Cap Hi1</i>	5' CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC 3'	Pesquisa de cápsula (gene <i>bexA</i>)	345
<i>Cap Hi2</i>	5' TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G 3'		
<i>Cap Hia1</i>	5' CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC 3'	Caracterização do serotipo a	250
<i>Cap Hia2</i>	5' GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG 3'		
<i>Cap Hib1</i>	5' GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC 3'	Caracterização do serotipo b	480
<i>Cap Hib2</i>	5' GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA 3'		
<i>Cap Hie1</i>	5' GGT AAC GAA TGT AGT GGT AG 3'	Caracterização do serotipo e	1350
<i>Cap Hie2</i>	5' GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG 3'		
<i>Cap Hif1</i>	5' GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC 3'	Caracterização do serotipo f	450
<i>Cap Hif2</i>	5' CGC AAT TAT GGA AGA AAG CT 3'		

ANEXO II

Anexo II. *Primers* utilizados para amplificação da região específica dos 7 genes “housekeeping” em *H. influenzae* (Meats *et al.* 2003) e tamanhos dos produtos esperados (pb).

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica	Tamanho esperado (pb)
<i>adK</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT GCA CCG GGT GCA GGT AA 3'	477
<i>atpG</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GCA GGT GCA AAA GAG AT 3'	447
<i>frdB</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTT ATC GTT GGT CTT GCC GT 3'	489
<i>fucK</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACC ACT TTC GGC GTG GAT GG 3'	345
<i>mdh</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCA TTG TAT GAT ATT GCC CC 3'	405
<i>pgi</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT GAA AAA ATC AAT CGT AC 3'	468
<i>recA</i> M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GCA ACT CAA GAA GAA AA 3'	426

As sequências do fago M13 encontram-se a Negrito.

ANEXO III

Anexo III. *Primers* utilizados para a detecção da presença/ausência dos fatores de virulência e respectivos tamanhos dos produtos esperados (pb).

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica	PCR em que são utilizados	Tamanho esperado (pb)	Referências
<i>hia3 F</i>	5' CAA AAT TTT TAA CGT TAT TTG GAA T 3'	Presença do gene <i>hia</i>	3259	Cardines <i>et al</i> , 2007
<i>hia6 R</i>	5' AAC GCC TGT TTT ACC TTG ACT AT 3'			
<i>fgHifA1F</i>	5' TGC TGT TTA TTA AGG CTT TAG 3'	Presença do gene <i>hifA</i>	810	Geluk <i>et al</i> , 1998
<i>fgHifA2R</i>	5' TTG TAG GGT GGG CGT AAG CC 3'			
<i>pilA F</i>	5' ATG AAA CTA ACA ACA CAG CAA ACC 3'	Presença do gene <i>pilA</i>	416	Vuong <i>et al</i> , 2013
<i>pilA R</i>	5' AAA TAA AGA GGC ATC CGT TCC 3'			
<i>hmw1A F</i>	5' GAA ACG CRR RTC CTT GAG 3'	Presença do gene <i>hmw1A</i>	140	Vuong <i>et al</i> , 2013
<i>hmw1A R</i>	5' GAC TTG ATG GTY YYY TGG TTG TAA A 3'			
<i>hmw2A F</i>	5' CGA AAC GCG TCC TTG AGA A 3'	Presença do gene <i>hmw2A</i>	199	Vuong <i>et al</i> , 2013
<i>hmw2A R</i>	5' TGC GCC ATT ACC ACT TGA GAA 3'			
<i>ompP5 F</i>	5' GCA TTA GTA GTT GCT GGC 3'	Presença do gene <i>ompP5</i>	1040	Duij <i>et al</i> , 1997
<i>ompP5 R</i>	5' TGC GAT TTC TAC ACG ACG 3'			

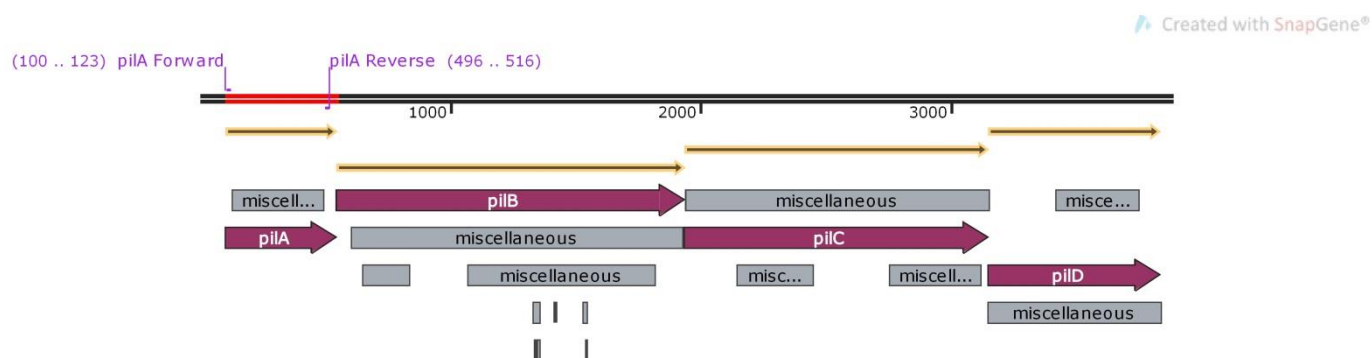
ANEXO IV

Anexo IV. Controlos utilizados nos ensaios de deteção de presença/ausência dos genes determinantes de virulência.

Gene	<i>H. influenzae</i> da coleção do LNR <i>H. influenzae</i> -INSA	
	Positivo	Negativo
<i>pilA</i>	Hi 13480	Hi 13605
<i>ompP5</i>	Hi 13480	Hi 13476
<i>hifA</i>	Hi 13601	Hi 13480
<i>hmw1A/2A</i>	Hi 13480	Hi 13548 (Hib)
<i>hia</i>	Hi 13605	Hi 13480

ANEXO V

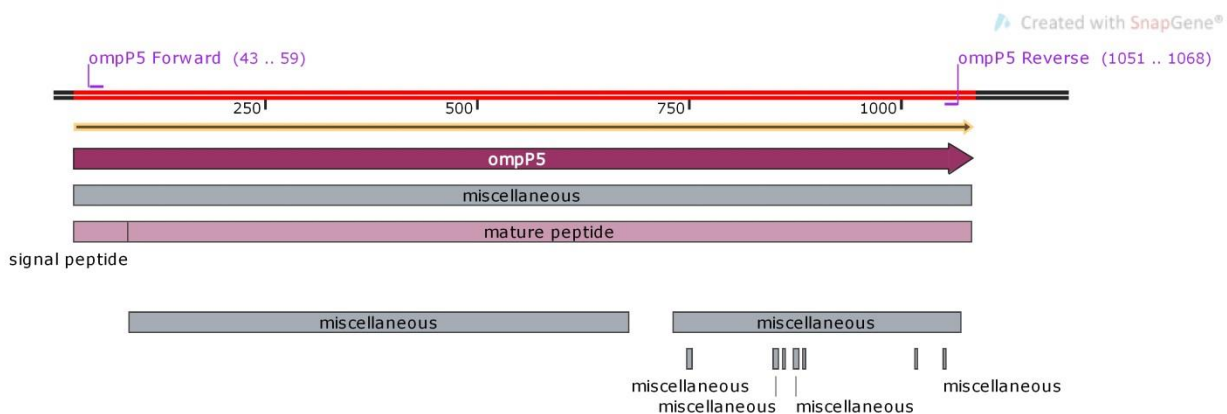
Anexo V. Representação esquemática do *coding DNA sequence* (cds) dos genes *pilA*, *pilB*, *pilC* e *pilD*, pertencentes ao *cluster pilABCD*.



Na figura estão assinalados os locais de ligação dos *primers* Forward e Reverse; a barra a vermelho representa o produto de amplificação esperado (416 pb). O esquema foi criado através do programa SnapGene Viewer 3.3.4 (disponível em <http://www.snapgene.com/>), tendo por base a estirpe de *H. influenzae* 86-028NP, com código de acesso GenBank AY816324.1 (3883 pb).

ANEXO VI

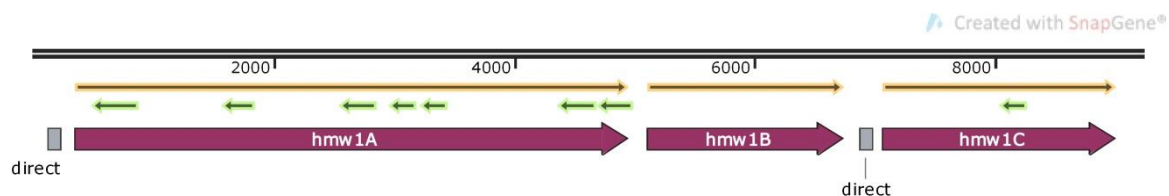
Anexo VI. Representação esquemática do cds do gene *ompP5*.



Na figura estão assinalados os locais de ligação dos *primers* Forward e Reverse; a barra a vermelho representa o produto de amplificação esperado (1040 pb). O esquema foi criado através do programa SnapGene Viewer 3.3.4 (disponível em <http://www.snapgene.com/>), tendo por base a estirpe de *H. influenzae* do serotipo b, com código de acesso GenBank L20309.1 (1195 pb).

ANEXO VII

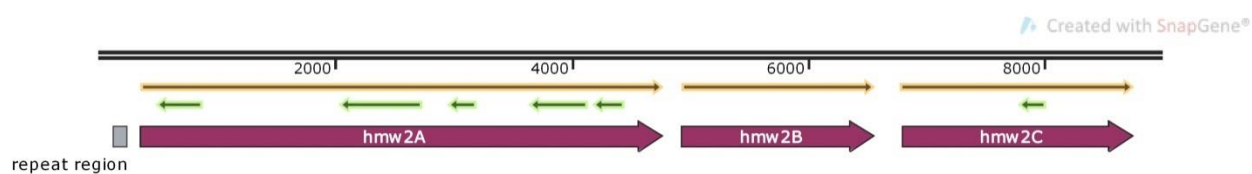
Anexo VII. Representação esquemática do cds do gene *hmw1A* e genes acessórios *hmw1B* e *hmw1C*.



Os *primers* não foram assinalados neste esquema, uma vez que para algumas estirpes existem mutações pontuais na zona do primer Reverse. O produto de amplificação esperado é de 140 pb. O esquema foi criado através do programa SnapGene Viewer 3.3.4 (disponível em <http://www.snapgene.com/>), tendo por base a estirpe de *H. influenzae* 12, com código de acesso GenBank U08876.1 (9221bp).

ANEXO VIII

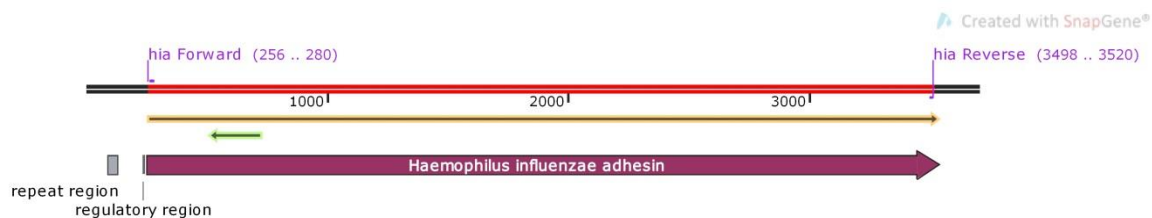
Anexo VIII. Representação esquemática do cds do gene *hmw2A* e genes acessórios *hmw2B* e *hmw2C*.



Os *primers* não foram assinalados neste esquema, uma vez que para algumas estirpes existem mutações pontuais na zona do primer Forward. O produto de amplificação esperado é de 199 pb. O esquema foi criado através do programa SnapGene Viewer 3.3.4 (disponível em <http://www.snapgene.com/>), tendo por base a estirpe de *H. influenzae* 12, com código de acesso GenBank U08875.1 (8983 pb).

ANEXO IX

Anexo IX. Representação esquemática do cds do gene *hia*.



Na figura estão assinalados os locais de ligação dos *primers* Forward e Reverse; a barra a vermelho representa o produto de amplificação esperado (3259 pb). O esquema foi criado através do programa SnapGene Viewer 3.3.4 (disponível em <http://www.snapgene.com/>), tendo por base a estirpe de *H. influenzae*, com código de acesso GenBank U38617.2 (3701 pb).

ANEXO X

Anexo X. Representação esquemática do cds do gene *hifA*.



Para a estirpe representada, este é o cds completo. Os *primers* utilizados incorporam ainda segmentos anteriores e posteriores ao gene (810 pb). O esquema foi criado através do programa SnapGene Viewer 3.3.4 (disponível em <http://www.snapgene.com/>), tendo por base a estirpe de *H. influenzae* 602, com código de acesso GenBank U91946.1 (651 pb).